

**Toleranzinduktion in CD8<sup>+</sup>  
T-Zellen durch  
kreuzpräsentierende  
DC**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctorum rerum naturalium  
an der  
Fakultät für Biologie  
der  
Ludwig-Maximilian-Universität  
München

vorgelegt von  
Samira Schroeder  
aus Braunschweig

München, 2008

|  |                     |
|--|---------------------|
| Erstgutachter:                         | Prof. Dr. E. Weiß   |
| Zweitgutachter:                        | PD Dr. C. Falk      |
| Betreuer der Arbeit (Sondergutachter): | Prof. Dr. T. Bocker |
| Eingereicht am:                        | 15.04.2008          |
| Tag der mündlichen Prüfung:            | 14.01.2009          |

Wesentliche Teile der vorliegenden Arbeit flossen in folgende Publikationen ein:

Neuenhahn, M., Kerksiek, K. M., Nauerth, M., Suhre, M. H., Schiemann, M., Gebhardt, F. E., Stemberger, C., Panthel, K., Schroeder, S., Chakraborty, T., Jung, S., Hochrein, H., Rüssmann, H., Bocker, T. und Busch, D. (2006). CD8 $\alpha^+$  Dendritic Cells Are Required for Efficient Entry of *Listeria monocytogenes* into the Spleen. *Immunity* 25, 619-630.

Luckashenak, N., Schroeder, S., Endt, K., Schmidt, D., Mahnke, D., Bachmann, M., Marconi, P., Deeg, C. and Bocker, T. (2008). Constitutive Crosspresentation of Tissue Antigens by Dendritic Cells Controls CD8 $^+$  T Cell Tolerance *in vivo*. *Immunity* 28, 521-532.

*If I have been able to see farther than others,  
it was because I stood on the shoulders of giants.*

*Isaac Newton*

# INHALTSVERZEICHNIS

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1 VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN .....</b>                              | <b>1</b>  |
| <b>2 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>  | <b>5</b>  |
| <b>3 EINLEITUNG .....</b>   | <b>7</b>  |
| <b>3.1 Das Immunsystem: Angeborene und adaptive Immunität.....</b>      | <b>7</b>  |
| <b>3.2 Die Entwicklung und Funktion von DC und T-Zellen.....</b>        | <b>9</b>  |
| <b>3.2.1 T-Zellen .....</b>   | <b>9</b>  |
| 3.2.1.1 T-Zellen und ihre unterschiedlichen Funktionen .....            | 10        |
| 3.2.1.2 T-Zellen und ihre Entwicklung .....                             | 12        |
| <b>3.2.2 Dendritische Zellen .....</b>                                  | <b>13</b> |
| 3.2.2.1 Die Subpopulationen von DC in der Maus .....                    | 13        |
| 3.2.2.2 DC und ihre Entwicklung .....                                   | 16        |
| 3.2.2.3 Ag-Erkennung und Ag-Aufnahme durch DC .....                     | 17        |
| 3.2.2.4 Induktion der DC-Reifung .....                                  | 19        |
| <b>3.3 Die Antigenpräsentation.....</b>                                 | <b>21</b> |
| <b>3.3.1 MHC Klasse II vermittelte Präsentation von Antigenen .....</b> | <b>22</b> |
| <b>3.3.2 Exosomen .....</b>   | <b>22</b> |
| <b>3.3.3 MHC Klasse I vermittelte Präsentation von Antigenen.....</b>   | <b>23</b> |
| <b>3.3.4 Kreuzpräsentation exogener Antigene .....</b>                  | <b>24</b> |
| <b>3.4 DC in Immunität und Toleranz .....</b>                           | <b>26</b> |
| <b>3.4.1 Zentrale Toleranz .....</b>                                    | <b>27</b> |
| <b>3.4.2 Periphere Toleranz.....</b>                                    | <b>27</b> |
| <b>3.5 Regulation von Zellbewegungen in Dendritischen Zellen .....</b>  | <b>29</b> |
| <b>3.6 Zielsetzung der Arbeit .....</b>                                 | <b>31</b> |
| <b>4 MATERIAL UND METHODEN .....</b>                                    | <b>33</b> |
| <b>4.1 Material.....</b>  | <b>33</b> |
| <b>4.1.1 Chemikalien .....</b>  | <b>33</b> |
| <b>4.1.2 Geräte.....</b>  | <b>33</b> |
| <b>4.1.3 Verbrauchsmaterialien .....</b>                                | <b>34</b> |
| <b>4.1.4 Proteine und Oligonukleotide.....</b>                          | <b>34</b> |
| <b>4.1.5 DNA-Längenstandard.....</b>                                    | <b>35</b> |
| <b>4.1.6 Pufferlösungen und Medien .....</b>                            | <b>36</b> |
| <b>4.1.7 Antikörper .....</b>   | <b>38</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>4.1.8 Versuchstiere .....</b>   | <b>39</b> |
| 4.1.8.1 CD11c-Rac1(N17).....   | 39        |
| 4.1.8.2 Rip-mOVA .....   | 40        |
| 4.1.8.3 OT-I und OT-II.....  | 40        |
| 4.1.8.4 C57BL/6 sowie C57BL/6 Thy1.1 und C57BL/6 Ly5.1 (B6SJL) .....                           | 40        |
| 4.1.8.5 BALB.B (C.B10-H2 <sup>b</sup> /LilMcdJ) .....  | 41        |
| <b>4.1.9 Virale Vektoren .....</b>   | <b>41</b> |
| <b>4.2 Methoden .....</b>  | <b>42</b> |
| <b>4.2.1 Molekularbiologische Methoden.....</b>  | <b>42</b> |
| 4.2.1.1 Agarose-Gelelektrophorese .....  | 42        |
| 4.2.1.2 Bestimmung der Protein-Konzentration .....   | 42        |
| 4.2.1.3 Isolierung genomischer DNA aus Gewebebiopsien .....                                    | 42        |
| 4.2.1.4 Polymerasekettenreaktion (PCR).....  | 43        |
| 4.2.1.5 Genotypisierung genomischer DNA.....   | 45        |
| <b>4.2.2 Zell- und immunbiologische Methoden.....</b>  | <b>46</b> |
| 4.2.2.1 Lymphozytenanreicherung aus peripherem Blut .....                                      | 46        |
| 4.2.2.2 Organentnahme und Herstellung einer Einzelzellsuspension .....                         | 47        |
| 4.2.2.2.1 Lymphknoten und Milz.....  | 47        |
| 4.2.2.2.2 Herstellung einer Einzelzellsuspension mit Dendritischen Zellen .....                | 48        |
| 4.2.2.3 Erythrozytenlyse in der Milzzellsuspension .....                                       | 49        |
| 4.2.2.4 Bestimmung der Zellzahl.....   | 49        |
| 4.2.2.5 Positive Selektion von T-Zellen aus einer Zellsuspension (MACS) .....                  | 49        |
| 4.2.2.6 Positive Selektion von Dendritischen Zellen aus einer Zellsuspension (MACS).....       | 51        |
| 4.2.2.7 Färbung von Lymphozyten mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper.....                  | 51        |
| 4.2.2.8 Intrazelluläre Zytokinfärbungen in T-Zellen .....                                      | 51        |
| 4.2.2.9 Nachweis Antigen-spezifischer T-Zellen mittels Pentameren.....                         | 52        |
| 4.2.2.10 Durchflusszytometrie (FACS Analyse) .....   | 53        |
| 4.2.2.11 Adoptiver Zelltransfer .....  | 54        |
| 4.2.2.12 Intravenöse Injektion in Mäuse .....  | 55        |
| 4.2.2.13 Immunisierungen von Mäusen .....  | 56        |
| 4.2.2.13.1 Immunisierung mit Peptid oder Protein und Lipopolysaccharid.....                    | 56        |
| 4.2.2.13.2 Immunisierung mit rekombinanten Viren (HSV-OVA oder MVA-OVA) .....                  | 56        |
| 4.2.2.13.3 Immunisierung mit Immunkomplexen.....   | 57        |
| 4.2.2.13.4 Immunisierung mit OVA-Partikeln.....  | 57        |
| 4.2.2.14 Markierung von Zellen mit Carboxyfluorescein-Diacetate-Succinimidylester (CFSE) ..... | 58        |
| 4.2.2.15 <i>In vivo</i> Zytotoxizitätstest .....   | 58        |
| 4.2.2.16 <i>In vivo</i> Kreuztoleranztest .....  | 60        |
| 4.2.2.17 <i>In vivo</i> Proliferationstest.....  | 60        |
| 4.2.2.18 Herstellung von Knochenmarkchimären .....   | 61        |
| <b>4.3 Statistik .....</b>   | <b>61</b> |

|   |            |
|---|------------|
| <b>5 ERGEBNISSE .....</b>   | <b>62</b>  |
| 5.1 Charakterisierung der CD11c-Rac1(N17) Tg <sup>+</sup> Mauslinie .....   | 63         |
| 5.1.1 Reduzierte <i>in vivo</i> Aktivierung von CD8 <sup>+</sup> T-Zellen durch lösliches OVA.....                              | 64         |
| 5.1.2 Normale <i>in vivo</i> Aktivierung von CD8 <sup>+</sup> T-Zellen durch lösliches OVA <sub>257-264</sub> .....             | 69         |
| 5.1.3 Normale <i>in vivo</i> Aktivierung spezifischer endogener CD8 <sup>+</sup> T-Zellen nach Immunisierung mit<br>Virus ..... | 71         |
| 5.1.4 Reduzierte <i>in vivo</i> Aktivierung von CD8 <sup>+</sup> T-Zellen durch Immunkomplexe.....                              | 74         |
| 5.1.5 Reduzierte <i>in vivo</i> Aktivierung von CD8 <sup>+</sup> T-Zellen durch OVA-Partikel.....                               | 77         |
| 5.1.6 Reduzierte <i>in vitro</i> Aufnahme von löslichem OVA.....  | 81         |
| 5.1.7 <i>In vitro</i> Prozessierung von löslichem OVA.....  | 82         |
| 5.1.8 <i>In vivo</i> Prozessierung von löslichem OVA.....   | 84         |
| 5.1.9 Normale <i>in vivo</i> Aktivierung von CD4 <sup>+</sup> T-Zellen durch lösliches OVA .....                                | 85         |
| 5.2 Rac1 defiziente CD8 <sup>+</sup> DC in der Toleranzinduktion von zytotoxischen T-Lymphozyten .....                          | 87         |
| 5.2.1 Reduzierte <i>in vivo</i> Proliferation autoreaktiver CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in Rac/Rip Mäusen.....                    | 87         |
| 5.2.2 Reduzierte periphere Toleranzinduktion in Rac/Rip Mäusen .....  | 90         |
| 5.2.3 Erhöhte Anzahl potentiell autoreaktiver CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in CD11c-Rac1(N17) Tg <sup>+</sup> Mäusen .....         | 93         |
| 5.2.4 Funktionaler Autoimmunitätstest in Chimären .....   | 94         |
| <b>6 DISKUSSION .....</b>   | <b>98</b>  |
| 6.1 Induktion von CD8 <sup>+</sup> T-Zell Immunität durch Rac1 defiziente DC .....  | 99         |
| 6.1.1 CD8 <sup>+</sup> T-Zell Immunität durch Kreuzpräsentation .....   | 99         |
| 6.1.2 CD8 <sup>+</sup> T-Zell Immunität durch direkte Ag-Präsentation.....  | 101        |
| 6.2 Die Rolle der Kreuzpräsentation in der Auslösung von Toleranz <i>in vivo</i> .....  | 103        |
| 6.2.1 Gewebsspezifische Ag und CD8 <sup>+</sup> T-Zell Proliferation in transgenen Mäusen.....                                  | 104        |
| 6.2.2 Gewebsspezifische Ag und periphere CD8 <sup>+</sup> T-Zell Toleranz in transgenen Mäusen.....                             | 104        |
| 6.2.3 Die Rolle der Kreuzpräsentation in der Induktion zentraler CD8 <sup>+</sup> T-Zell Toleranz.....                          | 108        |
| 6.2.4 Die Funktionalität potentiell autoreaktiver T-Zellen im GVHD-Mod .....  | 109        |
| 6.3 Die Bedeutung der Kreuztoleranz für therapeutische Ansätze.....   | 111        |
| <b>7 LITERATURVERZEICHNIS .....</b>   | <b>116</b> |
| <b>8 LEBENSLAUF .....</b>   | <b>136</b> |
| <b>9 DANKSAGUNG .....</b>   | <b>139</b> |





## 1 VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

Einheiten wurden mit dem international gebräuchlichen SI-System abgekürzt. Für Aminosäuren und Nukleotide wurde der Einbuchstabencode verwendet. Für die Abkürzung gebräuchlicher Wörter wurde gemäß Duden verfahren.

|      |   |
|------|---|
| Abb. | Abbildung   |
| Ag   | Antigen   |
| AIRE | Autoimmunregulator  |
| Ak   | Antikörper  |
| APC  | Antigenpräsentierende Zelle (engl.: <i>antigen presenting cell</i> )                  |
| BIO  | Biotin  |
| CD   | Oberflächenantigen (engl.: <i>cluster of differentiation</i> )                        |
| CLIP | engl.: <i>class-II associated invariant chain peptide</i>                             |
| CTL  | Zytotoxischer T-Lymphozyt (engl.: <i>cytotoxic T lymphocyte</i> )                     |
| DC   | Dendritische Zelle (engl.: <i>dendritic cell</i> )                                    |
| DC   | Dendritische Zellen (engl.: <i>dendritic cells</i> )                                  |
| DN   | Dominant negativ  |
| ds   | doppelsträngig  |
| Dttp | Desoxythreoningtriphosphat  |
| ELC  | engl.: <i>Eppstein-Barr virus-induced molecule 1 ligand chemokine, CCL19</i>          |
| ER   | Endoplasmatisches Retikulum   |
| FACS | Fluoreszenzaktivierter Zellsorter (engl.: <i>fluorescence activated cell sorter</i> ) |
| FBS  | Fötales Kälberserum (engl.: <i>foetal bovine serum</i> )                              |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat  |
| GAP  | GTPase-aktivierendes Protein  |
| GDP  | Guanosindiphosphat  |
| GEF  | Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (engl.: <i>guanine nucleotide exchange factor</i> )  |
| GVHD | Transplantat-gegen-Empfänger Krankheit (engl.: <i>graft-versus-host disease</i> )     |
| GTP  | Guanosintriphosphat   |

## 1 VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

---

|                  |   |
|------------------|---|
| GTPase           | Guanosin 5'-triphosphat spaltendes Enzym  |
| h                | Stunde (engl.: <i>hour</i> )  |
| H <sub>2</sub> O | Wasser  |
| HEV              | postkapilläre Venolen mit hohem Endothel (engl.: <i>high endothelial venules</i> )    |
| hi               | hoch (engl.: <i>high</i> )  |
| HVGR             | Empfänger gegen Transplantat Reaktion (engl.: <i>host-versus-graft reaction</i> )     |
| hsp              | Hitzeschockprotein  |
| IC               | Immunkomplex (engl.: <i>immune complex</i> )  |
| i.v.             | intravenous   |
| IFN              | Interferon  |
| Ig               | Immunglobulin   |
| Ii               | invariante Kette (engl.: <i>invariant chain</i> )                                     |
| IL               | Interleukin   |
| LC               | Langerhans Zelle  |
| LCA              | engl.: <i>leukocyte common antigen</i> (CD45.1)                                       |
| L-DC             | lymphoide Dendritische Zelle  |
| lo               | niedrig (engl.: <i>low</i> )  |
| LPS              | <i>Escherichia coli</i> -Lipopolysaccharid  |
| mAb              | monoklonaler Antikörper (engl.: <i>monoclonal antibody</i> )                          |
| M-DC             | myeloide Dendritische Zelle   |
| MFI              | mittlere Fluoreszenzintensität  |
| mHAgs            | Nebenhistokompatibilitäts-Antigene (engl.: <i>minor-histocompatibility antigens</i> ) |
| MHC              | Haupthistokompatibilitätskomplex (engl.: <i>major histocompatibility complex</i> )    |
| min              | Minuten   |
| MR               | Mannose Rezeptor  |
| NF-κB            | engl.: <i>nuclear factor of κB</i>  |
| NTL              | Nichttransgene Maus (engl.: <i>non transgenic littermate</i> )                        |
| OD               | Optische Dichte   |
| OVA              | Hühner-Ovalbumin  |
| PALS             | engl.: <i>periarteriolar lymphoid sheath</i>  |

|                  |  |
|------------------|--|
| PAMP             | pathogenspezifisches molekulares Muster (engl.: <i>pathogen-specific molecular pattern</i> ) |
| PBS              | Phosphatgepufferte Salzlösung (engl.: <i>phosphate buffered saline solution</i> )            |
| PCR              | Polymerasekettenreaktion (engl.: <i>polymerase chain reaction</i> )                          |
| P-DC             | plasmazytoide Dendritische Zelle   |
| PE               | Phycoerythrin  |
| PerCP            | Peridinin-Chlophyll-a Protein  |
| Rac              | engl.: <i>ras-related C3 botulinum toxin substrate</i>                                       |
| RT               | Raumtemperatur   |
| SA               | Streptavidin   |
| SD               | Standardabweichung (engl.: <i>standard deviation</i> )                                       |
| SDF-1            | engl.: <i>stroma cell derived factor-1</i> , CXCL12  |
| sek              | Sekunden   |
| SLC              | engl.: <i>secondary lymphoid tissue chemokine</i> , CCL21                                    |
| SR               | Fress-Rezeptor (engl.: <i>scavenger receptor</i> )   |
| Tab.             | Tabelle  |
| TAP              | engl.: <i>transporter associated with Ag presentation</i>                                    |
| TCR              | T-Zellrezeptor (engl.: <i>T cell receptor</i> )  |
| TECs             | Thymusepithelzellen (engl.: <i>thymic epithelial cells</i> )                                 |
| T <sub>h</sub>   | T-Helferzelle  |
| TLR              | Toll-ähnlicher Rezeptor (engl.: <i>Toll-like receptor</i> )                                  |
| T <sub>Reg</sub> | regulatorische T-Zelle   |
| v/v              | Volumen pro Volumen  |
| w/v              | Masse pro Volumen (engl.: <i>weight per volume</i> )   |
| w/w              | Masse pro Masse (engl.: <i>weight per weight</i> )   |
| WAS              | Wiskott-Aldrich Syndrom  |
| WASP             | Wiskott-Aldrich Syndrom Protein  |
| wt               | Wildtyp (C57BL/6)  |
| x                | mal  |



## 2 Zusammenfassung

Die Kontrolle von selbstreaktiven T-Zellen durch Toleranzmechanismen ist ein wichtiger Bestandteil des Immunsystems zur Vermeidung von Autoimmunkrankheiten. Man vermutet, dass Kreuzpräsentation von körpereigenen Ag in Abwesenheit einer Entzündung einen Mechanismus darstellen könnte, periphere CD8<sup>+</sup> T-Zell-Toleranz zu induzieren. Durch Kreuzpräsentation werden von Dendritischen Zellen (DC) Antigene (Ag), die nicht von DC selbst exprimiert werden (exogene Ag), im Kontext von MHC Klasse I an CD8<sup>+</sup> T Zellen präsentiert. Apoptotisches Material, welches von eigenen Geweben stammt, könnte dabei als Quelle für Selbstantigene dienen. Man hat kürzlich die Wichtigkeit der kleinen Rho-GTPase Rac1 für die Phagozytose apoptotischen Materials entdeckt. Um die Rolle von Kreuzpräsentation in der peripheren Toleranzinduktion durch DC *in vivo* zu untersuchen, wurde eine transgene Maus konstruiert, in der Rac1 DC-spezifisch inhibiert ist (CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup>).

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde diese Mauslinie zunächst näher charakterisiert. Es wurde gezeigt, dass die CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> Maus einen Defekt in der Kreuzpräsentation von löslichem Protein aufzeigt. Dabei war der Effekt unabhängig von der Art der Ag-Aufnahme. Die Präsentation endogener Ag in Form von Viren oder die Präsentation löslicher Peptide war indes normal. Durch Verwendung von OVA-Alexa Fluor 647 und DQ-OVA konnte festgestellt werden, dass in transgenen DC die Menge aufgenommenen OVA-Proteins reduziert und die Menge prozessierten OVA-Proteins normal bis leicht reduziert ist. Kerkisik et al. zeigten außerdem eine verminderte Phagozytose von zellassoziierten Ag durch transgene DC. Es ist insgesamt anzunehmen, dass eine verminderte Kreuzpräsentation zumindest zum Teil auf einem Defekt in der Ag-Aufnahme beruht, evtl. auch auf einen Defekt im Prozessierungsablauf. Eine reduzierte Ag-Präsentation von löslichen Ag durch transgene DC an CD4<sup>+</sup> T-Zellen konnte ausgeschlossen werden. Diese Ergebnisse zeigen zusammenfassend, dass die CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> Maus ein geeignetes Werkzeug darstellt, um die Rolle von Kreuzpräsentation *in vivo* zu studieren.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde weiterhin gezeigt, dass Kreuzpräsentation ein wichtiger Prozess ist, um periphere Toleranz zu induzieren und aufrechtzuerhalten. In einem Mausmodell für autoimmunen Diabetes (Rip-mOVA), löste die verminderte Kreuzpräsentation von membrangebundenem Ovalbumin (mOVA) im Pankreas Diabetes aus. Es wurde zwar weniger Proliferation der OT-I T-Zellen in doppeltransgenen Mäusen (Rac/Rip) als in Rip-mOVA Mäusen beobachtet, diese noch vorhandenen OT-I Zellen waren jedoch wegen verminderter Kreuztoleranz nicht anerg, wie es in Rip-mOVA Mäusen zu sehen

war. Das führte nach Immunisierung mit HSV-OVA schließlich zur Zerstörung der  $\beta$ -Inselzellen und damit zur Auslösung von Diabetes. Versuche, in denen T-Zellen von CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> Mäusen in Rezipienten mit Thy1.1 Hintergrund transferiert wurden, deuten auch darauf hin, dass in CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> Mäusen die Ausübung peripherer Toleranz inhibiert ist. Es sollte weiterhin gezeigt werden, ob die potentiell autoreaktiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen der transgenen Mauslinie ausreichen, um Autoimmunität in Form einer Transplantat-gegen-Empfänger Krankheit (GVHD) auszulösen. In Abwesenheit von CD4<sup>+</sup> T-Zellen blieben (auch) die (Kontroll-) Versuchstiere gesund. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass eine effektive Kreuzpräsentation auf die CD4<sup>+</sup> T-Zell Hilfe angewiesen ist.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, wie essentiell die ständige Kreuzpräsentation von exogenen Selbstantigenen für die Kontrolle von Autoimmunreaktionen ist.

## 3 EINLEITUNG

### 3.1 Das Immunsystem: Angeborene und adaptive Immunität

Die Immunabwehr in Vertebraten besteht aus dem angeborenen und adaptiven Immunsystem.

#### Das angeborene Immunsystem:

Das angeborene Immunsystem beinhaltet zur Bekämpfung von eindringenden Pathogenen wie Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten verschiedene Abwehrmechanismen. Dazu gehört neben der unspezifischen epithelialen Barrierefunktion oder einer ersten Abwehr durch chemische Substanzen und durch antibakterielle Enzyme auch die hochselektive Erkennung von konservierten Oberflächenmolekülen eines Krankheitserregers durch spezifische Rezeptoren, die auf allen zellulären Komponenten (wie Makrophagen, Neutrophilen, Granulozyten und Dendritischen Zellen) des angeborenen Immunsystems exprimiert werden. Sind Pathogene in den Organismus eingedrungen, so treffen sie in den Epithelien sofort auf phagozytierende Dendritische Zellen (DC) und Makrophagen, welche durch diese Rezeptoren bestimmte Oberflächenmoleküle der Pathogene erkennen und sie aufnehmen können. Makrophagen werden dadurch aktiviert, Zytokine (= Proteine, die von Zellen sezerniert werden, um das Verhalten anderer Zellen durch sie zu beeinflussen, welche Rezeptoren für diese Zytokine besitzen) und Chemokine (chemotaktisch wirkende Proteine, welche Zellen aus dem Blut anlocken, die Rezeptoren für diese Chemokine besitzen; hauptsächlich Neutrophile und Makrophagen) zu sekretieren und initiieren damit eine Entzündung. Das Hervorrufen einer Entzündung kann durch die Aktivierung des Komplementsystems verstärkt werden. Bei diesem handelt es sich um ein System aus Plasmaproteinen, welche eine Kaskade proteolytischer Reaktionen auf der Oberfläche von Pathogenen, nicht aber auf eigenen Zellen, aktiviert. Die umgebenden Blutgefäße erweitern sich und werden permeabler, so dass Blut langsamer fließt. Zirkulierende Leukozyten fangen an, sich an Adhäsionsmoleküle im Innern der Blutgefäße zu haften, welche sich nahe der Entzündung durch Zytokine und Komplement vermehrt bilden. Durch die erhöhte Durchlässigkeit der Blutgefäße können die Leukozyten nun zwischen den Endothelzellen der Blutgefäße durchschlüpfen (Extravasation) und angelockt durch die freigesetzten Chemokine zum Ort der Entzündung wandern. Neutrophile und Monozyten (Monozyten differenzieren im Gewebe zu Makrophagen) sind die hauptsächlichen Zelltypen, die hier in der Initiierungsphase der Entzündung zu finden sind, um mit ihren Rezeptoren für Pathogene und Komplementbestandteilen zur Zerstörung von Pathogenen beizutragen. Mit den diversen Abwehrmechanismen des angeborenen Immunsystems wird während der ersten vier bis sieben Tage sichergestellt, dass eine

Infektion in Schach gehalten wird, bis die adaptive Immunantwort einsetzen kann.

#### Adaptive Immunantwort:

DC und Makrophagen können rezirkulierenden T-Lymphozyten (T-Zellen) in den benachbarten (drainierenden) Lymphknoten aber auch Antigene (Ag) präsentieren und Ag-spezifische T-Zellen aktivieren. Ag-tragende B-Lymphozyten (B-Zellen), die durch diese Lymphknoten migrieren, können hier ebenso durch die Hilfe einiger aktivierter T-Zellen angehalten und aktiviert werden. DC sind dabei besonders darauf spezialisiert, T-Zellen Ag zu präsentieren (Banchereau and Steinman, 1998). Noch unreife DC, welche ständig zwischen Blut, peripherem Gewebe, Lymphe und lymphatischen Organen patrouillieren, nehmen dafür zunächst Protein-Antigene am Entzündungsherd auf, prozessieren sie in kleine Peptide, wandern währenddessen durch afferente lymphatische Gefäße zu den drainierenden Lymphknoten, reifen zu professionellen antigenpräsentierenden Zellen (engl.: *antigen presenting cell*, APC) heran (zur DC-Reifung siehe auch 3.2.2.2 bis 3.2.2.4) und präsentieren hier den T-Zellen die verarbeiteten Peptide im Kontext von Molekülen des Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse I oder II (engl.: *major histocompatibility complex*, MHC-I oder MHC-II). Die nun aktivierten T-Zellen fangen an, zu proliferieren und in Effektorzellen zu differenzieren. Sie migrieren ebenso anhand spezifischer Adhäsion, gelenkt durch Chemokine vom Lymphknoten zum Ort der Entzündung und tragen zur Eliminierung von Pathogenen bei.

Das Besondere an T- und B-Lymphozyten sind deren Antigen-Rezeptoren, die sich in jeder dieser Zellen im naiven Zustand unterscheiden. Dadurch bilden die zahlreichen Lymphozyten im Körper Rezeptoren mit Millionen verschiedenen Spezifitäten gegen alle vorstellbaren Antigene aus. Potentiell selbstreaktive Lymphozyten werden jedoch schon im Rahmen der zentralen Toleranz durch klonale Deletion eliminiert, so dass Immunreaktionen gegen Selbstantigene (Autoimmunreaktionen) zum größten Teil verhindert werden. Eine klonale Deletion von B-Zellen findet im Knochenmark statt, wo sie sich auch entwickeln und von T-Zellen im Thymus, also noch bevor Lymphozyten in der Peripherie ihre Rezirkulation und damit die Suche nach Antigenen starten. Falls dennoch selbstreaktive Lymphozyten existieren, können sie durch periphere Toleranzmechanismen (siehe 3.4.2) unschädlich gemacht werden.

Neben der Flexibilität ist auch das Immunologische Gedächtnis eine herausragende Eigenschaft des adaptiven Immunsystems. Es ermöglicht eine schnelle und spezifische Antwort auf Reinfektionen. Die adaptive Immunantwort ist langsamer als die angeborene, jedoch ist sie flexibler und kann auch solche Pathogene bekämpfen, die sich im Laufe der Zeit so weiterentwickelt haben, dass sie der angeborenen Immunantwort ausweichen können.



Dennoch ist das adaptive Immunsystem ohne die Instruktionen des angeborenen Immunsystems, welches zwischen Selbst- und Fremd-Ag unterscheiden kann, machtlos. Dieses erteilt dem adaptiven System Instruktionen, die Informationen darüber enthalten, ob, wie und wo eine Immunantwort stattfinden soll.

### **3.2 Die Entwicklung und Funktion von DC und T-Zellen**

Als eine zelluläre Komponente des angeborenen Immunsystems bilden DC eine Brücke zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem. DC können aufgenommene antigene Peptide auf MHC Klasse I und Klasse II präsentieren. Damit wird die Präsentation von antigenen Peptiden an CD8<sup>+</sup> (über MHC Klasse I) und CD4<sup>+</sup> T-Zellen (über MHC Klasse II) ermöglicht (Guermónprez et al., 2003; Rescigno et al., 1998). Neben der Eliminierung von Fremdanitigenen durch das adaptive Immunsystem ist auch die „Stilllegung“ potentiell selbstreaktiver Lymphozyten durch so genannte Toleranzmechanismen nicht wegzudenken (siehe auch 3.4). Im Rahmen dieser Doktorarbeit nehmen die Dendritischen Zellen und deren Einfluss auf die Entstehung von Immunität oder Toleranz eine besondere Bedeutung ein. Insbesondere den Wechselwirkungen zwischen DC und CD8<sup>+</sup> T-Zellen widmet sich daher die weitere Einführung. Besprochen werden die Entwicklung und Funktion von T-Zellen und DC, sowie die Mechanismen der Ag-Aufnahme und -Präsentation durch DC und schließlich die Rolle der Kreuzpräsentation in Immunität und Toleranz.

#### **3.2.1 T-Zellen**

T-Zellen rezirkulieren zwischen verschiedenen sekundären lymphatischen Organen, in denen APC auf die Präsenz passender Antigene hin untersucht werden. Um den gesamten Körper auf Ag hin zu untersuchen, sind T-Zellen abhängig von der Bewegung der Ag aus den peripheren Organen über die Lymphe oder das Blut zu den sekundären lymphatischen Organen, entweder in gelöster Form oder assoziiert mit APC. Jedes der sekundären lymphatischen Organe präsentiert dabei die unterschiedlichsten Ag der umgebenden Gewebe, wobei die Milz aus dem Blut stammende Ag anbietet und die Lymphknoten Ag aus den unmittelbar umliegenden Geweben (Heath et al., 2004). T-Zellen erkennen Ag nur, wenn sie durch körpereigene Zellen in kleinen Peptidfragmenten als Peptid:MHC (pMHC) -Komplex präsentiert werden.

Es handelt sich bei den MHC-Molekülen um stark polymorphe Membranglykoproteine,

welche erstmals im Zusammenhang mit Abstoßungsreaktionen von transplantiertem Gewebe entdeckt wurden. Jedes Individuum besitzt einen bestimmten Haplotyp. Auf Populationsebene wird auf diese Weise sichergestellt, dass unterschiedliche antigene Strukturen eines Pathogens präsentiert werden und sich das Pathogen nicht weiter ausbreiten kann. Zur Identifizierung infizierter Zellen ist MHC-Klasse I auf allen kernhaltigen Zellen des Körpers zu finden (Pamer and Cresswell, 1998; Rock and Goldberg, 1999). MHC-Klasse II dahingegen ist in der Maus nur auf B-Zellen, Makrophagen, DC und Thymusepithelzellen zu finden.

Antigene können von Viren oder intrazellulären Bakterien stammen, welche sich im Zytosol körpereigener Zellen selbst replizieren. Diese Zellen prozessieren das endogene Fremdatigen und präsentieren es in kleinen Peptidfragmenten auf der Zelloberfläche, so dass sie als infiziert erkennbar sind. Endogene Ag können aber auch körpereigener Natur sein (Autoantigene). Ag können ebenso von Pathogenen oder deren Produkten stammen, die in extrazellulärem Fluid durch phagozytierende Zellen (DC oder Makrophagen) endozytiert und prozessiert werden. Solche für die APC exogenen Ag können aber auch von eigenen absterbenden Geweben abstammen oder von im Fluid vorhandenen körpereigenen Molekülen.

#### **3.2.1.1 T-Zellen und ihre unterschiedlichen Funktionen**

T-Zellen werden in zwei große Klassen mit unterschiedlichen Effektorfunktionen, die  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen untergliedert. Die zwei Zelltypen unterscheiden sich in der Erkennung von MHC Molekülen, wobei  $CD4^+$  T-Zellen Peptide exogener Herkunft auf MHC II erkennen, während  $CD8^+$  T-Zellen MHC-Klasse I-gebundene endogene Peptide erkennen. Eine Ausnahme, auf die später ein größeres Augenmerk gelegt wird, stellt die Kreuzpräsentation dar, in der auch exogenes Material durch  $CD8^+$  DC in Form von pMHC-Klasse I-Komplexen an  $CD8^+$  T-Zellen präsentiert wird. CD4 und CD8 sind für eine effektive T-Zell Antwort essentiell und werden daher als Korezeptoren bezeichnet (siehe auch Ag-Präsentation 3.3).

Die primäre Funktion der aktivierten  $CD4^+$  T-Zellen ist es, andere Effektorzellen zu aktivieren. Dies benötigt die Stimulation durch pMHC-Klasse II-Komplexe (Signal eins) und durch kostimulatorische Moleküle (Signal zwei, siehe  $CD8^+$  T-Zellen) sowie durch weitere Faktoren, die die Polarisierung der T-Zelle beeinflussen. Zwei funktionelle Gruppen werden unter den  $CD4^+$  T-Zellen unterschieden, die T-Helferzellen ( $T_h$ )  $T_{h1}$  und  $T_{h2}$ .  $T_{h1}$  Zellen aktivieren Phagozyten (meist Makrophagen), den infektiösen Inhalt ihrer Vesikel zu zerstören (zelluläre Immunität) und können  $CD8^+$  T-Zellen sowie NK-Zellen aktivieren.  $T_{h2}$  Zellen

aktivieren spezifische B-Zellen, um Ak zu produzieren (humorale Immunität), was wiederum auch einen Einfluss auf Mastzellen und Eosinophile hat. Die Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen kann durch regulatorische T<sub>h3</sub>- oder T<sub>R1</sub>-Zellen gehemmt werden (Fehervari and Sakaguchi, 2004).

Die Aufgabe der CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist das Abtöten infizierter Zellen, daher werden sie auch zytotoxische T-Zellen genannt (engl.: *cytotoxic T lymphocyte*, CTL). Aktiviert werden CTL dazu, indem ihr spezifischer Ag-Rezeptor (T-Zell Rezeptor, engl.: *T-cell receptor*, TCR) und der Korezeptor CD8 den passenden pMHC-Klasse I-Komplex bindet (erstes Signal). Um die Effektorfunktion der CTL zu induzieren, ist weiterhin ein kostimulatorisches Signal nötig (Signal zwei), das von derselben APC geliefert wird, sofern sie selbst zuvor durch Pathogene aktiviert worden ist. Die am besten untersuchten kostimulatorischen Moleküle sind B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86), die CTL mit ihrem Liganden CD28 binden. Nicht alle potentiell selbstreaktiven T-Zellen werden im Thymus negativ selektioniert. Das liegt daran, dass manche Proteine nur von speziellen Zellen in peripheren Geweben exprimiert werden und sie im Thymus daher nicht für die Selektion zur Verfügung stehen. Daher ist es wichtig, dass Ag-Präsentation und Kostimulation von ein und derselben APC ausgeführt werden. Selbstreaktive CTL könnten sonst Selbst-Ag von körpereigenen Zellen aufspüren, kostimulierende Signale von anderen Zellen erhalten und dem eigenen Organismus schaden. Spüren DC einmal Selbst-Ag auf, werden keine kostimulatorischen Moleküle produziert und für das Ag spezifische T-Zellen werden anerg (= Inaktivierung) oder apoptotisch (= programmierter Zelltod).

Curtsinger et al. haben weiterhin gezeigt, dass CD8<sup>+</sup> T-Zellen keine Effektorfunktionen ausüben, so lange nicht ein drittes Signal in Form von IL-12 präsent ist (Curtsinger et al., 2003).

Die Aktivierung der CTL durch Ag-Bindung und Kostimulation verursachen zunächst die verstärkte Produktion von IL-2 und der  $\alpha$ -Kette des IL-2 Rezeptors (IL-2R $\alpha$ ), so dass eine darauf folgende Bindung von IL-2 an den eigenen, nun kompletten, IL-2 Rezeptor (IL-2R) die CTL in den Zellzyklus überführt. Das ermöglicht schließlich ein Zellwachstum über einige Tage hinweg von zwei bis drei Teilungen pro Tag und die Differenzierung zu bis zu 10<sup>4</sup> CD8<sup>+</sup> Effektorzellen (Butz and Bevan, 1998; Callan et al., 1998; Doherty, 1998) mit jeweils einem identischen Ag-Rezeptor. Die erwähnte Induktion von Anergie in naiven CTL wird vermutlich durch fehlende IL-2 Signale ausgelöst. Neben Effektorzellen werden auch Gedächtniszellen gebildet. CTL Effektorzellen migrieren schließlich zum Ort der Infektion, wo sie Virus-infizierte Zellen, Tumorzellen oder auch mit Parasiten befallene Zellen zerstören, die den passenden pMHC-Klasse I-Komplex tragen. Durch verschiedene

Mechanismen wird ohne weitere Kostimulation deren Zelltod induziert. Zum einen mittels Fas-Liganden der CTL, zum anderen mittels zytoplasmatischer lytischer Granula, deren Inhalt, Perforin und Granzym B, von den CTL ausgeschüttet wird. Der Zelltod tritt innerhalb von zwei bis sechs Stunden ein.

Es ist gezeigt worden, dass CTL Antworten auf Viren und Gewebetransplantate weiterhin die Hilfe von  $CD4^+$  T-Zellen zu benötigen scheinen.  $CD4^+$  T-Zellen aktivieren in diesem Falle infizierte APC, mehr kostimulierende Moleküle zu exprimieren, welche dann für das gleiche Ag spezifische CTL aktivieren können.

#### 3.2.1.2 T-Zellen und ihre Entwicklung

Die Entstehung und Entwicklung von T-Zellen beginnt im Knochenmark aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen. Hieraus entstehen lymphoide Vorläuferzellen, aus denen sich T- und B-Zellen entwickeln können. Diese Vorläuferzellen wandern für die T-Zell Entwicklung zum Thymus, während B-Zellen sich im Knochenmark oder der fötalen Leber entwickeln (Anderson et al., 1996). Das bereits angesprochene diverse Repertoire an T-Zell Rezeptoren wird während der Entwicklung der T-Zellen im Thymus von deren Vorläuferzellen gebildet. Dafür werden DNA-Sequenzen, welche für die variable Region (V-Region) des T-Zell Rezeptors codieren, nach einem gewissen Zufallsprinzip somatisch rekombiniert. Bei diesen DNA-Sequenzen handelt es sich um separate Gensegmente, die man V-, D- und J-Gensegmente nennt.

Der T-Zell Rezeptor ähnelt im Aufbau dem Immunglobulin (Ig). Er besteht aus zwei verschiedenen Polypeptidketten, welche T-Zell Rezeptor  $\alpha$  (TCR $\alpha$ ) und T-Zell Rezeptor  $\beta$  (TCR $\beta$ ) heißen und über eine Disulfidbrücke verbunden sind. Eine Minderheit von T-Zellen trägt einen strukturell gleich aufgebauten  $\gamma:\delta$  TCR, seine immunologische Funktion ist jedoch noch nicht ganz aufgeklärt. Jede Kette des  $\alpha:\beta$  Heterodimers besteht aus einer variablen (engl.: *V-like domain*) und einer konstanten Domäne (engl.: *C-like domain*). Die beiden variablen Domänen bilden zusammen die Antigen-Binderegion. Über eine Transmembranregion sind die TCR in der Zellmembran der T-Zelle verankert und ragen mit einem sehr kurzen zytoplasmatischen Schwanz in das Zytoplasma. Dieser ist nicht ausreichend, um Signale von außen ins Zellinnere weiterzuleiten. Diese Funktion übernimmt der am TCR assoziierte CD3/ $\zeta$  Komplex (van Oers et al., 1995) mit einer vergleichbar längeren zytoplasmatischen Domäne.

Nachdem Vorläuferzellen ihren TCR gebildet haben, wird dieser im Thymus nun darauf getestet, mit welcher Affinität und Spezifität er im Thymus präsentierte Ag binden kann.

Davon hängt ab, ob eine T-Zelle stirbt oder sich weiterentwickelt. In dieser so genannten positiven Selektion überleben nur solche Vorläuferzellen die relativ schwach ihr Ag, welches auf körpereigenen MHC Molekülen präsentiert wird, gebunden haben (Sebzda et al., 1999). Solche T-Zellen, die kein pMHC-Komplex binden konnten, würden auch in der Peripherie keine fremden Ag binden können, werden daher deletiert. So wird sichergestellt, dass T-Zellen körpereigenes MHC erkennen, Voraussetzung für die Erkennung von Peptiden während einer Infektion. Während einer negativen Selektion werden solche T-Zellen deletiert, die relativ stark einen pMHC-Komplex im Thymus binden konnten (Sebzda et al., 1999). Das Aufkommen solcher T-Zellen würde in der Peripherie zu Reaktionen gegen Selbstantigene und damit zur Zerstörung körpereigener Gewebe führen. Man bezeichnet diesen Vorgang daher auch als zentralen Toleranzmechanismus (siehe 3.4.1).

Während der Entwicklung der T-Zellen verändern sich auch Oberflächenproteine wie der CD3-Komplex und die Korezeptorproteine CD4 und CD8. Vorläuferzellen, die noch keinen TCR gebildet haben, sind noch  $CD3^+CD4^+CD8^+$ . Hat die T-Zelle einen so genannten vorläufigen TCR gebildet ( $pT\alpha:\beta$ ), ist sie doppelt positiv für CD4 und CD8. Erst nach der positiven Selektion verlieren T-Zellen einen der beiden Marker und erhöhen die Expression des endgültigen TCR. Als reife  $CD4^+$  oder  $CD8^+$  T-Zelle verlässt diese den Thymus und wandert in die Peripherie ein (Nikolic-Zuqic, 1991).

### **3.2.2 Dendritische Zellen**

Dendritische Zellen befinden sich in lymphoiden Organen, in fast allen Geweben und Epithelien und repräsentieren dort ca. 1-2% aller Zellen (Banchereau et al., 2000; Banchereau and Steinman, 1998). Sie erhielten ihren Namen durch die charakteristische Form mit langen, verzweigten zytoplasmatischen Fortsätzen. Unreife DC fangen in den Geweben Ag ein, reifen und präsentieren die Ag in den drainierenden Lymphknoten naiven T-Zellen. DC haben als professionelle APC die Fähigkeit, naive T-Zellen zu aktivieren und damit deren Expansion und Differenzierung in Effektorzellen zu induzieren.

#### **3.2.2.1 Die Subpopulationen von DC in der Maus**

Es wurde nun schon mehrfach deutlich, dass DC unterschiedliche T-Zell-Reaktionen hervorrufen können. Doch wie ist es möglich, dass DC z. B. die  $T_{H1}/T_{H2}$  Balance regulieren können und wie können sie Informationen weiterleiten, die darüber entscheiden, ob

Immunität oder Toleranz ausgeübt wird? Dafür ist ein komplexes System von Zellen nötig, das von verschiedenen DC-Subtypen ausgemacht wird. Unter verschiedenen Konditionen in deren Mikromilieu können diese DC-Zelltypen in verschiedenen Reifungsstadien solch kontrastreiche Begebenheiten wie Immunität und Toleranz induzieren (Banchereau et al., 2000).

DC der Maus wurden ursprünglich unterteilt in die „lymphoiden“ (L-DC)  $CD8a^+ CD11b^- DEC205^+$  und die „myeloiden“ (M-DC)  $CD8a^- CD11b^+ DEC205^-$  Subpopulationen (Shortman, 2000), welche alle den gemeinsamen DC-Marker CD11c exprimieren. CD11c gehört zu einer Familie von Adhäsionsmolekülen, die aus einer großen  $\alpha$ -Kette (CD11) und einer nicht-kovalent gebundenen  $\beta$ -Kette (CD18) bestehen. Sie werden auch als  $\beta_2$ -Integrine ( $M_r$ : 95 kDa) klassifiziert. CD8 wird auf DC in der Form eines  $\alpha\alpha$ -Homodimers exprimiert, im Unterschied zu dem  $\alpha\beta$ -Heterodimer, welches typisch für T-Zellen ist. Die Unterteilung der DC-Subtypen in L-DC und M-DC wurde kürzlich in Frage gestellt, da gezeigt wurde, dass sich *in vitro* aus Vorläuferzellen beider Subtypen, die aus dem Knochenmark isoliert wurden, jeweils beide DC-Typen entwickeln konnten. Aus M-DC Vorläufern konnten sich ebenso Langerhans Zellen (LC) entwickeln (Shortman and Wu, 2001). Dieser Zelltyp befindet sich im Epithel der Haut und dient zum Aufspüren von Pathogenen, die über die Haut in den Organismus gelangen (Romani et al., 2003). Charakteristisch für diese Subpopulation sind bestimmte intrazelluläre Vesikel, die so genannten Birbeck-Granula. Von den Langerhans Zellen unterscheiden sich nur unwesentlich die dermalen bzw. interstitiellen DC. Ihnen fehlen die Birbeck-Granula und sie weisen eine signifikant niedrigere Expression des zur Mannose-Rezeptor-Familie gehörenden Moleküls DEC205 (CD205) auf (Henri et al., 2001). Die eigentlich ungenauen Bezeichnungen „myeloide DC“ und „lymphoide DC“ werden auch heute weiterhin verwendet.

#### Lymphoide $CD8a^+$ DC:

Dieser DC-Subtyp ist in der Milz vorwiegend in der T-Zell-Zone der *periarteriolar lymphoid sheath* (PALS) und im Thymus zu finden.  $CD8a^+$  DC exprimieren im Gegensatz zu  $CD8a^-$  DC CD1d und das Lektin DEC-205. Diese Zellen können relativ große Mengen IL-12 produzieren und  $T_{H1}$ -Antworten induzieren (Moser and Murphy, 2000). Dieser DC-Subtyp hat die besondere Fähigkeit, apoptotische Zellen zu internalisieren und Ag zu endozytieren. Mit löslichem oder zellassoziertem Hühner-Ovalbumin (OVA) wurde gezeigt, dass  $CD8^+$  DC das Ag besser im MHC-Klasse I Kontext präsentieren können, während  $CD8^-$  DC es besser im MHC-Klasse II Kontext präsentieren (den Haan et al., 2000). Die Präsentation des exogenen OVA-Antigens an  $CD8^+$  T-Zellen nennt man Kreuzpräsentation (*cross-presentation*). Durch Kreuzpräsentation können professionelle APC einerseits Immunität gegen Pathogene

induzieren (Kreuzimmunität, engl.: *cross-priming*) (den Haan et al., 2000), andererseits können sie Toleranz (Kreuztoleranz, engl.: *cross-tolerance*) gegenüber Selbstantigenen induzieren, welche nicht von den DC selbst exprimiert werden.

#### Myeloide CD8a<sup>-</sup> DC:

CD8a<sup>-</sup> DC konzentrieren sich unter nicht-infektiösen Bedingungen in der Marginalzone der Milz, migrieren aber in die T-Zell-Zone, sobald sie mit mikrobiellem Material stimuliert werden (De Smedt et al., 1996). CD8a<sup>-</sup> DC produzieren keine bedeutenden Mengen an IL-12. Sie induzieren vorwiegend T<sub>H2</sub>-Antworten und konnten injiziertes OVA nicht kreuzpräsentieren (Pooley et al., 2001; Pulendran et al., 2001). Da CD8a<sup>-</sup> und CD8a<sup>+</sup> DC sich nicht besonders in ihrer Fähigkeit zu endozytieren unterscheiden (Ruedl and Bachmann, 1999), wird vermutet, dass das entweder an Prozessierungsdefekten in CD8a<sup>-</sup> DC liegt oder daran, dass das injizierte OVA nicht gleichermaßen zugänglich für die verschiedenen DC-Subtypen war (Guermont et al., 2002). Vor kurzem hat man den CD8a<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup> DC-Subtypen weiter untergliedert in eine CD4<sup>+</sup> und eine CD4<sup>-</sup> Untergruppe (Shortman, 2000). Die funktionalen Unterschiede beider Untergruppen konnte man bisher aber noch nicht hinreichend aufklären.

#### Plasmazytoide DC:

Kürzlich wurde in Lymphorganen eine dritte Untergruppe der DC entdeckt, die der „plasmazytoiden“ DC (P-DC). Sie exprimieren Ly6C, Gr-1 sowie B220 und wenig CD11c (CD11c<sup>lo</sup>) (Asselin-Paturel et al., 2001; Bruno et al., 2001; Nakano et al., 2001; O’Keeffe et al., 2003). P-DC haben eine charakteristische plasmazytoide Erscheinung und auf virale oder andere mikrobielle Stimuli reagieren sie mit einer hohen IFN- $\alpha$  Produktion. Dies geschieht hauptsächlich durch Ligandenbindung an die Toll-ähnlichen Rezeptoren (engl.: *Toll-like receptors*, TLR) auf der Zelloberfläche. Im Gegensatz zu humanen M-DC, welche an Stellen lokalisiert sind, an denen Pathogene für gewöhnlich eintreten (wie Haut, Mukosa), findet man humane P-DC hauptsächlich in der T-Zell Zone von Lymphorganen. Die dort gefundenen P-DC konnten Ag durch Endozytose oder Makropinozytose in jeglichen Reifungsstadien nur schlecht aufnehmen (Grouard et al., 1997). Es wird daher vermutet, dass P-DC darauf spezialisiert sind, Selbstantigene oder über das Blut überbrachte Pathogene wie Viren zu erkennen (Robinson et al., 1999).

Die funktionale Plastizität der DC ist vor allem abhängig vom Typ des Pathogens und vom umgebenden Mikromilieu. Der Pilz *Candida albicans* z. B. stimuliert DC im so genannten *yeast stage*, IL-12 zu produzieren, so dass eine T<sub>H1</sub> Antwort induziert wird. Im *hyphae stage*

regen sie DC jedoch zur IL-4 Produktion an, was eine  $T_{H2}$  Antwort induziert (d'Ostiani et al., 2000). DC, die aus den Peyer-Plaques, Atmungsorganen oder der Leber isoliert wurden, induzieren vorwiegend  $T_{H2}$  Antworten. Dahingegen induzieren DC aus der Milz vorwiegend  $T_{H1}$  Antworten (Schuurhuis et al., 2006). Alles in allem scheinen diese unterschiedlichen Effekte Auswirkungen verschiedener Zytokin-Mikromilieus und der Anwesenheit verschiedener Pathogene zu sein. Zusätzlich entscheiden die unterschiedliche Herkunft der DC und deren Reifungsstadium (erkennbar am entsprechenden Muster aus Oberflächenrezeptoren) über die weitere Effektorfunktion. Eine nicht unbedeutende Rolle könnte auch spielen, dass DC proinflammatorische Zytokine, Chemokine und IL-12 nur in kurzen Perioden produzieren und das nur zu bestimmten Stadien des Reifungsprozesses (Langenkamp et al., 2000).

#### 3.2.2.2 DC und ihre Entwicklung

Die Herkunft und das Reifungsstadium der DC sind enorm wichtig für die Richtung, die die induzierte Immunantwort schließlich einschlägt. Die Entwicklung der DC verläuft in mehreren Stufen. Zunächst generieren hämatopoetische pluripotente Stammzellen im Knochenmark kontinuierlich  $CD34^+$  Vorläufer-DC, welche anschließend im Blut zirkulieren (Flores-Romo, 2001). Diese Vorläuferzellen wandern aus dem Blut in die verschiedensten Gewebe und lassen sich dort nieder. DC sind an Körperepithelien wie Haut (Schuler and Steinman, 1985), Atemwege (Holt et al., 1988), Lymphatische Gewebe (Steinman and Cohn, 1974), Blut (Van Voorhis et al., 1983), afferente Lymphatische Gefäße (Drexhage et al., 1979) und im interstitiellen Raum vieler Organe (Hart and Fabre, 1981) lokalisiert. Mit großer Kapazität zum Endozytieren und Phagozytieren wachen sie dort über eingedrungene Fremdkörper, die sie sehr effizient aufnehmen können (Banchereau et al., 2000; Banchereau and Steinman, 1998). In diesem Zustand exprimieren DC noch nicht in ausreichendem Maße kostimulierende Faktoren, um effizient T-Zellen zu aktivieren. Mikrobielle Pathogene bzw. Antigene dringen zumeist über die Haut, den Gastrointestinaltrakt oder über den respiratorischen Trakt in den Organismus ein. Janeway CA Jr (Janeway, 1989; Janeway, 1992) fand heraus, dass DC solche Pathogene durch Rezeptoren binden, die bestimmte Strukturen von Pathogenen erkennen (engl.: *pattern-recognition receptors*). Durch Stimulation solcher Rezeptoren wird die Reifung von DC stimuliert, sie durchlaufen einen fundamentalen Entwicklungsprozess (Thery and Amigorena, 2001): (1) Die Fähigkeit zu weiterer Internalisierung von extrazellulären Partikeln nimmt stark ab. (2) Die Expression von stabilem MHC Klasse I- und II wird heraufreguliert. (3) CD86 sowie andere Mitglieder der



B7 Familie werden stärker exprimiert. (4) Zytokine werden neusynthetisiert, die die Proliferation und Differenzierung von T-Zellen beeinflussen und (5) die Wanderungsfähigkeit der DC nimmt stark zu (Steinman and Nussenzweig, 2002). Während im unreifen Entwicklungsstadium verstärkt Oberflächenrezeptoren für inflammatorische Chemokine wie z.B. CCR1, CCR2, CCR5 und CCR6 exprimiert werden, um die DC zu Entzündungsorten im Organismus zu leiten, werden auch diese nach Antigenaufnahme herunterreguliert. Dies ermöglicht den DC, entzündliche Gewebe zu verlassen, um letztendlich in den sekundären lymphatischen Organen naive T-Lymphozyten zu aktivieren. Die Art der DC-Aktivierung entscheidet darüber, ob eine T-Zelle auf ein Antigen reagiert, wie sie darauf reagiert und wo diese Reaktion stattfinden wird (Kapsenberg, 2003). Um zu den sekundären lymphatischen Organen zu gelangen, wird die Expression konstitutiv exprimierter Oberflächenrezeptoren wie z.B. CCR4, CCR7 und CXCR4 heraufreguliert. Dies ermöglicht die Orientierung durch die Bindung mit den entsprechenden Liganden wie SDF-1 oder SLC auf lymphatischen Endothelzellen (Banchereau and Steinman, 1998; Hartgers et al., 2000; Sallusto et al., 1998). Die Durchwanderung der postkapillären Venolen mit hohem Endothel (engl.: *high endothelial venules*, HEV), die nötig ist um in lymphatische Gewebe einzuwandern, wird auch durch bestimmte Adhäsionsmoleküle wie z.B. DC-SIGN erreicht. Am Ende des Reifungsprozesses wird durch Expression des CCR7-Liganden ELC das Einwandern in die T-Zell-Zonen im Lymphknoten ermöglicht (Baekkevold et al., 2001).

### **3.2.2.3 Ag-Erkennung und Ag-Aufnahme durch DC**

Wie erkennen DC in den Geweben aber die verschiedenen Antigene, durch die verschiedene Immunantworten ausgelöst werden und welche Mechanismen der Antigenaufnahme gibt es? Es wurde gezeigt, dass unreife DC sehr effektiv exogene Partikel in Form von löslichen Peptiden, Molekülen, größeren Komplexen (wie z.B. Zelltrümmer nekrotischer Zellen), ganzen apoptotischen Zellen oder ganzen Pathogenen durch Endozytose (Sallusto et al., 1995; Sallusto and Lanzavecchia, 1994), Phagozytose (Inaba et al., 1993; Moll et al., 1993) sowie Pinozytose (Sallusto et al., 1995) in Endosomen internalisieren. Verschiedene Oberflächen-Rezeptoren der DC vermitteln die Endozytose und Phagozytose sowie die anschließende Reifung der DC und Präsentation prozessierter Ag.

#### Rezeptorvermittelte Endozytose:

Die rezeptorvermittelte Endozytose erlaubt die Aufnahme von Makromolekülen durch

spezialisierte Regionen der Plasmamembran, die man englisch *coated pits* nennt. Nach Ag-Bindung verursacht eine Signalweiterleitung durch den Rezeptor die Bereitstellung von Clathrin für die Neubildung endozytotischer Vesikel (Slepnev and De Camilli, 2000). Zu den Rezeptoren, die Endozytose vermitteln, zählen zum Beispiel:

(1) C-Typ Lektin-ähnliche Rezeptoren (engl.: *C-type lectin receptor*) wie der Mannose-Rezeptor (Sallusto et al., 1995) und DEC205 (Jiang et al., 1995), mit denen Mono- und Oligosaccharide aufgenommen werden.

(2) Spezifische Rezeptoren für Hitzeschockproteine (hsp), wie gp96 und hsc 70 vermitteln die Internalisierung von hsp (Kuppner et al., 2001; Singh-Jasuja et al., 2000). Hsp können aus Tumorzellen oder infizierten Zellen stammen; hsp-assoziierte Peptide aus solchen Zellen werden ebenso aufgenommen und präsentiert.

(3) Die Komplementrezeptoren CR3 und CR4 (Reis e Sousa et al., 1993) sowie so genannte „Fress-Rezeptoren“ (engl.: *scavenger receptors*, SR) werden ebenso auf DC exprimiert, deren Liganden hauptsächlich Lipoproteine bakterieller Herkunft sind, die aber auch zur Bindung und Internalisierung apoptotischer Zellen fungieren (Nakamura et al., 2001; Platt et al., 1998).

(4) Rezeptoren für die Fc-Domäne von Immunglobulinen (FcγR und FcεR) binden die Fc Domänen von IgG und IgE. Zurzeit sind vier Klassen von FcR bekannt: FcγRI, FcγRII, FcγRIII und FcγRIV (Nimmerjahn et al., 2005). Diese wiederum variieren in unterschiedlichen Isoformen (Ravetch and Bolland, 2001). FcγR binden Immunkomplexe mit sehr hoher Affinität, was in einer verstärkten Antigenaufnahme im Vergleich zu Nicht-Komplexen resultiert (Regnault et al., 1999). Auf FcγR zielende Antigene begünstigen die Kreuzpräsentation, welche TAP abhängig ist (Amigorena and Bonnerot, 1999a; Amigorena and Bonnerot, 1999b). Die Bindung an einen FcγR induziert außerdem eine vollständige DC-Reifung, welche sich durch erhöhte Expression von MHC, CD40, CD80, CD86 und der erhöhten IL-12 Produktion bemerkbar macht. Diese verstärkte Ag-Aufnahme durch DC und die DC-Reifung induzieren eine spezifische cytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort und resultieren damit in der so genannten „Lizenz zum Töten“ (Schuurhuis et al., 2006; Schuurhuis et al., 2002).

#### Phagozytose und Makropinozytose:

Exogene Ag können auch durch Aktin-abhängige Phagozytose bzw. Makropinozytose aufgenommen werden, was in der Bildung intrazellulärer Vakuolen resultiert. Während die

Phagozytose rezeptorabhängig ist, stellt die Makropinozytose einen, in unreifen DC vorkommenden, rezeptorunabhängigen Aufnahmemechanismus dar. Makropinozytose wird als eine Art Endozytose gelöster Moleküle durch Membraneinstülpungen beschrieben, welche vom Zytoskelett abhängig ist. Dies erlaubt unreifen DC die konstante, schnelle und unspezifische „Überwachung“ großer Mengen des sie umgebenden Fluids (Sallusto et al., 1995). Unreife DC phagozytieren nahezu alle Arten von Bakterien (Bell et al., 1999) sowie apoptotische und nekrotische Partikel (Guermónprez et al., 2002), welche in T-Zell Zonen der Lymphknoten transportiert werden (Huang et al., 2000). In DC wurde Phagozytose apoptotischer Partikel durch einen Rezeptor-Komplex beschrieben, der CD36,  $\alpha\text{v}\beta 5$  oder  $\alpha\text{v}\beta 3$  beinhaltet. Die Signaltransduktion soll über den molekularen Komplex CrkII-Dock180-rac1 laufen (Albert et al., 2000; Albert et al., 1998a; Rubartelli et al., 1997). Die Effizienz der Kreuzpräsentation konnte signifikant verstärkt werden, indem Ag an Latexpartikel konjugiert wurden, wodurch Phagozytose der Ag forciert wurde (Kovacsócs-Bankowski et al., 1993; Shen et al., 1997). Während der Reifung der DC wird die Fähigkeit, Ag aufzunehmen, herunter reguliert. Neben der Herabregulation von Ag-Rezeptoren kann auch die Inaktivierung der kleinen Rho GTPasen rac1 und cdc42 eine weitere Ag-Aufnahme durch Phagozytose oder Makropinozytose blockieren (Garrett et al., 2000; West et al., 2000).

### 3.2.2.4 Induktion der DC-Reifung

DC können indirekt eine Infektion bemerken, z.B. über inflammatorische Zytokine, interne zelluläre Komponenten oder spezifische laufende Immunreaktionen und darauf mit Reifung reagieren. Sie können aber Pathogene auch direkt über Rezeptoren erkennen, die sogleich Gefahrensignale ins Zellinnere weiterleiten (Gallucci and Matzinger, 2001). Es wurden fünf verschiedene Arten von Rezeptoren bezeichnet, die eine DC-Reifung vermitteln können:

(1) *Toll-like receptors*: Die Oberfläche von Pathogenen weist typischerweise sich wiederholende Muster molekularer Strukturen auf (engl.: *pathogen-specific molecular patterns* (PAMP)). Bakterielle DNA beinhaltet beispielsweise unmethylierte Wiederholungen des Dinukleotids CpG. Viren exprimieren meist unverwechselbare doppelsträngige RNA (dsRNA). Rezeptoren, die diese regelmäßigen Muster erkennen, werden auch „*pattern-recognition receptors*“ bezeichnet. Die Bindung von Pathogenen kann durch bestimmte Rezeptoren auch die Expression kostimulatorischer Moleküle und die Einleitung einer adaptiven Immunantwort signalisieren. Am besten verstanden ist in dem Zusammenhang die Familie eines bis zum Säugetier konservierten Transmembran-Rezeptors, der lediglich dazu zu dienen scheint, Signale von außen ins Zellinnere zu leiten (Medzhitov and Janeway, 2000).

Diese so genannten *Toll-like receptors* wurden erstmals in *Drosophila melanogaster* entdeckt, in der TLRs als Antwort auf eine Infektion intrazelluläre Kaskaden einschalten, welche zur Bildung antibiotisch wirksamer Peptide führen. TLR sind Transmembranproteine, die eine Leucinreiche Region in der extrazellulären Domäne aufweisen. In Mäusen wurden bis jetzt elf verschiedene TLR entdeckt. Die Antwort auf ein bestimmtes PAMP ist dabei verknüpft mit der Expression eines bestimmten TLR. PAMP wie Lipopolysaccharid (LPS), bakterielle DNA und doppelsträngiger RNA (dsRNA) verursachen eine DC-Reifung (Guermonprez et al., 2002; Medzhitov et al., 1997). LPS, welches von Gram-negativen Bakterien stammt, wird dabei von TLR4 (und CD14) erkannt (Aderem and Ulevitch, 2000). LPS ist wahrscheinlich das stärkste mikrobielle Stimulans im angeborenen Immunsystem.

(2) Zytokinrezeptoren: DC erkennen Gefahren und Infektionen auch durch Mediatoren, wie  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$  oder  $\text{PGE-2}$ , dessen Sekretion durch Pathogene verursacht wird (Banchereau et al., 2000; Kalinski et al., 1999).

(3) Signale von T-Zellen: Eine DC-Reifung kann weiterhin durch Signale von T-Zellen verursacht werden wie CD40L (Caux et al., 1994; Cella et al., 1996; Koch et al., 1996). CD40L wird auf T-Zellen exprimiert, nachdem eine erfolgreiche Aktivierung über den pMHC-Komplex und kostimulatorische Moleküle erfolgt ist, also z.B. nachdem DC ihnen ein Fremdantigen präsentiert haben. Es scheint aber auch einen CD40 unabhängigen Mechanismus zu geben. Fas und OX40L auf DC induzierten durch Bindung von FasL und OX40 auf T-Zellen eine Reifung von DC (Ohshima et al., 1997; Rescigno et al., 2000).

(4) Fc-Rezeptoren: Die meisten Fc-Rezeptoren, wie  $\text{Fc}\gamma\text{RI}$ ,  $\text{Fc}\gamma\text{RIII}$  und  $\text{Fc}\gamma\text{R}$  induzierten nach Bindung von Immunkomplexen oder spezifischer Antikörper eine DC-Reifung (Geissmann et al., 2001; Jurgens et al., 1995; Regnault et al., 1999).

(5) Sensoren für Zelltod: Shi et al. (Shi et al., 2000) haben gezeigt, dass Zellverletzungen Adjuvantien enthaltende Komponenten freilassen, welche T-Zell Antworten verstärken. Sauter et al. und Gallucci et al. zeigten, dass nekrotischer nicht aber apoptotischer Zelltod eine DC-Reifung verursachten. Andererseits verursachten apoptotische Körper eine DC-Reifung (Gallucci et al., 1999; Propato et al., 2001; Sauter et al., 2000). Inwiefern diese Thesen der Realität entsprechen ist fraglich, da eine LPS-Kontamination oder CD40L Expression nicht ausgeschlossen werden können. Welche Bestandteile genau die DC-Reifung verursachten, ist unklar, in Frage kommen jedoch Nukleotide oder Hitzeschockproteine (Basu et al., 2000; Gallucci and Matzinger, 2001; Singh-Jasuja et al., 2000).

(6) Auch in Abwesenheit von Infektionen wurde DC-Reifung nachgewiesen, z. B. im Zusammenhang mit Transplantationen (Larsen et al., 1990), Kontaktallergien (Enk and Katz, 1992) oder Autoimmunität (Abrams et al., 2000).

### 3.3 Die Antigenpräsentation

Die intrazelluläre Ag-Prozessierung und das Beladen von MHC Molekülen mit Peptidantigenen in APC hat man während der letzten 20 Jahre sehr detailliert erforscht.

Exogene Ag werden in einem so genannten *endocytic pathway* auf MHC Klasse II Moleküle geladen (siehe 3.3.1). Mehrere Arbeiten deuten darauf hin, dass sogar endogene Ag über diesen Weg auf MHC Klasse II präsentiert werden können (Guermónprez et al., 2002).

Endogene Ag werden im Endoplasmatischen Retikulum (ER) auf MHC Klasse I Moleküle geladen (siehe 3.3.3). Endogene, im Zytosol der Zelle auftretende, Antigene werden entweder direkt durch Pathogene synthetisiert (z.B. durch Viren) oder gelangen durch Mikroben (z.B. *Listeria monocytogenes*), die nach ihrer Phagozytose den Phagosomen entweichen können, ins Zytosol. Damit wurde erklärt, dass MHC Klasse I-restringierte Effektor-CD8<sup>+</sup>-T-Zellen selektiv virusinfizierte Zellen töten können, dabei aber benachbarte Zellen aussparen können, die inaktive Viren oder apoptotische infizierte Zellen internalisiert haben und auf MHC Klasse II präsentieren.

Etwa vor 30 Jahren hat M. Bevan jedoch gezeigt, dass man CTL *in vivo* mit exogenen, auf MHC Klasse I präsentierten Ag aktivieren kann und nannte diese Funktion *cross-priming* (Bevan, 1976) (siehe auch 3.3.4). Werden exogene Antigene nach Aufnahme und Prozessierung auf MHC Molekülen präsentiert (=Kreuzpräsentation) und gleichzeitig kostimulatorische Signale durch die APC vermittelt, können naive zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen aktiviert werden. Die Kreuzpräsentation ermöglicht somit auch die Aktivierung antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch exogenes Material, das durch Zellen präsentiert wird, die keine kostimulatorischen Fähigkeiten besitzen. Sie liefert folglich einen wichtigen Beitrag z. B. zur Bekämpfung von solchen Pathogenen, die sich nicht im Zytosol der DC vermehren. APC können außerdem virusinfizierte Zellen phagozytieren und im Anschluss Virusantigene über die eigenen MHC I Moleküle an CD8<sup>+</sup> T-Zellen kreuzpräsentieren. Auch entartete Zellen, die tumorspezifische Antigene auf MHC I-Molekülen präsentieren, können so von CD8<sup>+</sup> T-Zellen beseitigt werden. Erst später entwickelte man eine Definition der Kreuzpräsentation, die auch MHC-Klasse II restringierte Ag mit einbezog. Antigene, die für die APC selbst exogen sind, können als pMHC-Klasse II Komplex an CD4<sup>+</sup> T-Zellen

kreuzpräsentiert werden. Eine weiterhin beschriebene CD1-abhängige Ag Präsentation wird hier nicht näher erläutert, da über die Funktion von CD1 kaum etwas bekannt ist.

#### 3.3.1 MHC Klasse II vermittelte Präsentation von Antigenen

Nach der Internalisierung von exogenen Antigenen werden diese in den Endosomen enzymatisch durch Proteasen verdaut, bevor sie auf MHC Klasse II Molekülen an CD4<sup>+</sup> T Zellen präsentiert werden können. Die das Antigen enthaltenden Endosomen werden während der Wanderung durch das Zytosol immer saurer. Der absinkende pH-Wert aktiviert schließlich die im Endosom enthaltenen Proteasen, welche Antigene proteolytisch in 12-25 Aminosäuren lange Fragmente verdauen. Im Endoplasmatischen Retikulum (ER) werden währenddessen die polymorphen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten der MHC Klasse II Moleküle synthetisiert. Je drei der  $\alpha\beta$ -MHC II-Dimere assoziieren mit einem Trimer der Invarianten Kette (engl.: *invariant chain*, Ii) (Cresswell, 1996). Ii stabilisiert die  $\alpha\beta$ -Untereinheiten und verhindert, dass ungewollt Peptide im Peptidbindungsspalt binden. Vom ER wird dieser Komplex über den Golgi-Apparat in Vesikeln zu den Endosomen/ Lysosomen transportiert, in denen sich die degradierten antigenen Peptide befinden. Es folgt eine Verschmelzung beider Vesikel, woraufhin Ii durch die angesäuerte, proteasehaltige Umgebung stufenweise degradiert wird. Zunächst bleibt ein 24 Aminosäuren langes Peptidfragment (CLIP, engl.: *class II-associated invariant chain peptide*) im Bindungsspalt der MHC Klasse II Bindungstasche zurück. Um die degradierten Antigen-Peptide gegen CLIP auszutauschen, wird ein dem MHC II-Molekül ähnliches Protein (H-2M) verwendet, das ebenfalls im MHC kodiert ist, allerdings nicht polymorph ist und auch nicht mit Ii assoziieren kann. Durch die Bindung von Peptid wird der gesamte Komplex stabilisiert, so dass er lange genug auf der Zelloberfläche exprimiert werden kann, um von CD4<sup>+</sup> T Zellen erkannt zu werden.

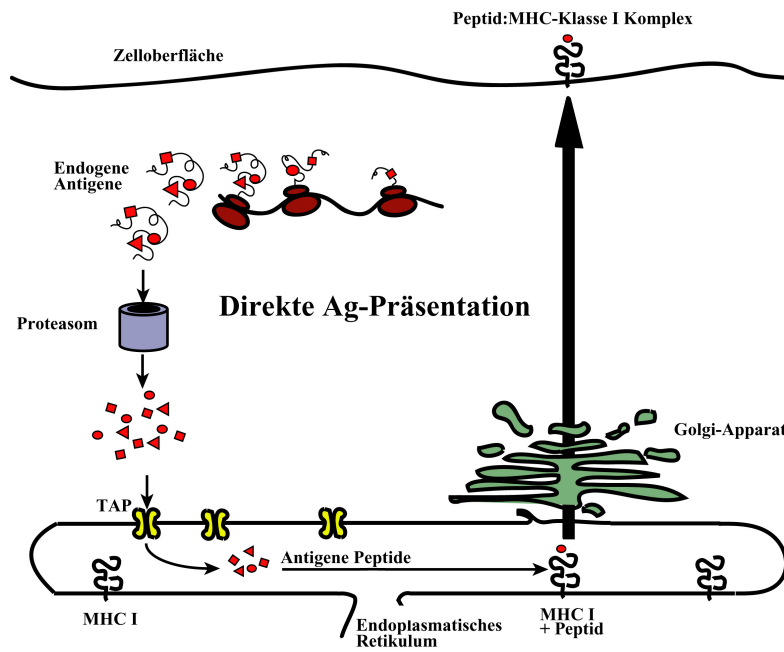
#### 3.3.2 Exosomen

Die meisten  $\alpha\beta$ Ii Trimere werden in spezialisierte MHC II enthaltende multivesikuläre Kompartimente sortiert, die MIIC (engl.: *MHC class II-enriched compartments*) heißen. Bei der Verschmelzung von MIIC mit der Plasmamembran wird ein Teil der MHC-II Moleküle auf die Zelloberfläche transportiert. Der Großteil der MHC-II Moleküle befindet sich jedoch auf den Vesikeln des MIIC, welche bei Fusion mit der Plasmamembran als Exosomen freigelassen werden. Diese Exosomen exprimieren neben MHC-II auch MHC-I,

kostimulatorische Moleküle wie B7.2, Integrine, Mitglieder der Ig Familie, hsp, Proteine des Zytoskeletts und andere Proteine (Übersichtsartikel: (Schuurhuis et al., 2006). Es wurde gezeigt, dass von APC freigelassene Exosomen eine immunregulatorische (Denzer et al., 2000) sowie auch eine tolerogene Rolle spielen (Karlsson et al., 2001). Jedoch war die Präsenz von DC *in vitro* essentiell, um eine effiziente Ag-Präsentation durch Exosomen an T-Zellen zu erhalten (Thery et al., 2002a; Vincent-Schneider et al., 2002). Es wird vermutet, dass Exosomen neben der direkten Ag-Präsentation zur intrazellulären Kommunikation innerhalb des Immunsystems beitragen, indem Ag und pMHC-Komplexe z. B. zwischen verschiedenen DC ausgetauscht werden.

### 3.3.3 MHC Klasse I vermittelte Präsentation von Antigenen

MHC Klasse I Moleküle werden im ER synthetisiert (siehe schematische Darstellung Abb. 3.1). Kurz nach der Synthese der schweren Kette assoziiert diese nicht-kovalent mit einer nicht-polymorphen leichten Kette, dem  $\beta$ 2-Mikroglobulin. MHC I wird schließlich im ER mit Peptid beladen. Die meisten dieser Peptide stammen aus dem Zytosol der Zelle und sind damit für diese endogen. Die Antigen-Prozessierung beginnt dabei mit der Ubiquitinierung im Zytosol (Pamer and Cresswell, 1998; Rock and Goldberg, 1999). Mit Ubiquitin zum Abbau markierte Proteine werden ATP-abhängig im Proteasom degradiert, welches im Zytosol lokalisiert ist. Es handelt sich bei den Proteasomen um Komplexe, die aus multiplen Untereinheiten bestehen. Die Proteasom-Synthese selbst kann durch das inflammatorische Zytokin  $\text{INF}\gamma$  gesteigert werden, was einem erhöhten Bedarf an Antigenprozessierung und Präsentation Rechnung trägt. Nach der Peptid-Generation im Zytosol findet mit Hilfe des TAP Transporters (engl.: *transporter associated with Ag presentation*) (Sigal et al., 1999) eine ATP-abhängige Translokation in die ER-Membran statt, wo neusynthetisierte MHC Klasse I Moleküle mit dem Peptid beladen werden (Norbury et al., 1997; Pamer and Cresswell, 1998). TAP ist ein Heterodimer, bestehend aus den zwei Untereinheiten TAP1 und TAP2, welche beide für eine effiziente ATP-unabhängige Peptid-Bindung benötigt werden. Auf der Lumenseite des ER ist TAP über ein Linkerprotein (Tapasin) an neusynthetisierte MHC I-Moleküle nicht-kovalent gebunden. Genau wie die Proteasom-Synthese, wird auch die Synthese von TAP durch  $\text{INF}\gamma$  gesteigert. Das Beladen der MHC I-Moleküle geschieht durch den Austausch von Tapasin gegen das durch TAP transportierte Antigen. Der somit erst entstandene Komplex aus  $\alpha$ -Kette,  $\beta$ 2-Mikroglobulin und Peptid ist nun so stabilisiert, dass er das ER verlassen und über den Golgi-Komplex in Vesikeln an die Zelloberfläche transportiert werden kann.



**Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der MHC-Klasse I Beladung mit endogenen Peptiden.** (Abb. angelehnt an Heath, Belz et al. 2004)

### 3.3.4 Kreuzpräsentation exogener Antigene

Randolph et al. zeigten, dass die rezeptorunabhängige Makropinozytose Dendritischer Zellen zu Kreuzpräsentation der aufgenommenen löslichen Ag führte (Randolph et al., 1998). Der bedeutendste Weg der Ag-Aufnahme mit anschließender Kreuzpräsentation ist aber vermutlich die Phagozytose, was unter anderem eindrucksvoll mit an Latexpartikeln gebundenen Ag gezeigt wurde (Kovacsovics-Bankowski et al., 1993; Shen et al., 1997) sowie mit der Phagozytose von Bakterien (Rescigno et al., 1998; Wick and Ljunggren, 1999) oder von apoptotischen Zellen (Berard et al., 2000; Subklewe et al., 2001). Auch die FcR-vermittelte Aufnahme von Immunkomplexen (Regnault et al., 1999) oder hsp-gebundenen Peptiden (Guernonprez et al., 2002) führten zu sehr effektiver Kreuzpräsentation. Es wurden bisher drei Möglichkeiten in Betracht gezogen, wie exogene Ag Zugang zur MHC I Beladungsmaschinerie erhalten.

(1) Die erste beschreibt einen TAP-unabhängigen Weg, in dem die zu prozessierenden Antigene vermutlich in Endosomen hydrolysiert werden und schließlich auf wiederaufbereitete MHC Klasse I Moleküle geladen werden, welche im Endosom vorhanden sind (Guernonprez et al., 2002; Pfeifer et al., 1993).



(2) Eine weitere Möglichkeit der Antigenbeladung ist der so genannte *phagosome-to-cytosol* Signalweg, welcher abhängig von Proteasomen und TAP ist. Hier wird MHC Klasse I letztlich im Lumen des ER mit Peptid beladen und die resultierenden pMHC-Klasse I-Komplexe werden über den sekretorischen Weg an die Zelloberfläche transportiert (Guermónprez et al., 2002; Kovacsovics-Bankowski et al., 1993; Kovacsovics-Bankowski and Rock, 1995; Pfeifer et al., 1993; Regnault et al., 1999). In Systemen, in denen lösliches OVA, Latexpartikel-gebundenes OVA oder Ig-gebundenes OVA verwendet wurde, wies man in DC eine TAP-abhängige Kreuzpräsentation nach (Kovacsovics-Bankowski and Rock, 1995; Norbury et al., 1997; Regnault et al., 1999).

(3) Erst kürzlich wurde gezeigt, dass während oder kurz nach der Antigenaufnahme Phagosomen mit Vesikeln des ER fusionieren. Diese ER-Vesikel enthalten die neu synthetisierten MHC Klasse I-Moleküle und zusätzlich die zur Beladung notwendigen Bestandteile wie z.B. TAP und Tapasin (Ackerman et al., 2003; Guermónprez et al., 2003; Houde et al., 2003). In diesem so genannten *ER-phagosome fusion pathway* werden die Antigene wahrscheinlich aus den fusionierten Vesikeln über einen multimolekularen Kanal (Sec 61-Komplex) ins Zytosol transportiert (Romisch, 1999; Wiertz et al., 1996) (siehe Abb. 3.2). Es werden allerdings auch andere Proteinkanäle wie z.B. TAP in Verbindung mit der Translokation in Verbindung gebracht (Jarosch et al., 2002; Johnson and van Waes, 1999; Matlack et al., 1998; van Endert, 1996). Es folgt eine Degradation durch im Zytosol lokalisierte Proteasomen und sofortiger Rücktransport mittels TAP Transporter in das Lumen selbiger Phagosomen. Hier werden die Peptide dann auf phagosomale MHC Klasse I Moleküle geladen (Ackerman et al., 2003; Guermónprez et al., 2003; Houde et al., 2003), und nicht wie im *phagosome-to-cytosol pathway* im ER.

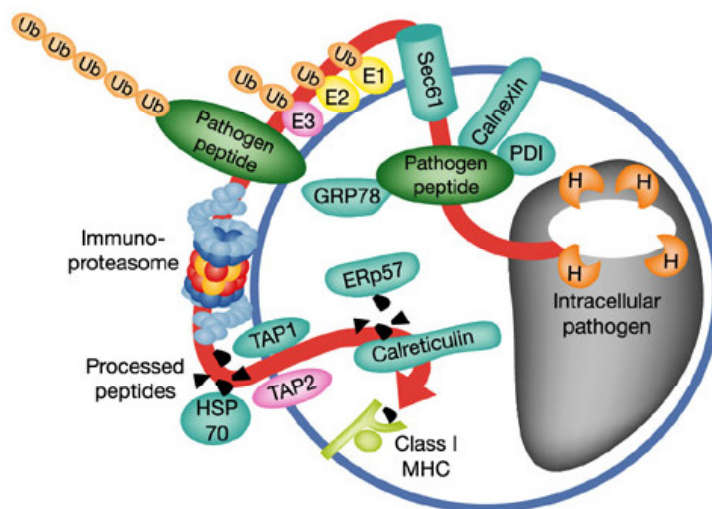


Abbildung 3.2: „ER-phagosome fusion pathway“ (entnommen aus Houde et al., 2003).

Es wird angenommen, dass der von Proteasomen und TAP abhängige Prozessierungsweg im Allgemeinen in Immunantworten gegen Transplantate, Tumoren, Viren und gelöste partikuläre Antigene involviert ist. Die Präsentation exogener Antigene kann signifikant verbessert werden, indem Antigene z. B. mit Polystyren-Mikropartikeln oder Hitzeschockproteinen komplexiert werden oder wenn sie in Form von Ag-Ak Immunkomplexen oder innerhalb von Bakterien oder apoptotischen Zellen verabreicht werden. Auch in der Entwicklung von peripherer Toleranz (siehe 3.4.2) spielt dieser Signalweg eine tragende Rolle.

Das Phänomen der Kreuzpräsentation kann nicht bei allen APC in gleicher Weise beobachtet werden. Für Makrophagen konnte Kreuzpräsentation nachgewiesen werden (Bellone et al., 1997), jedoch bisher keine Kreuzimmunität, welche charakteristisch für DC zu sein scheint (Albert et al., 1998b; Kurts et al., 2001; Ronchetti et al., 1999). Für B-Zellen konnte hingegen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Fähigkeit zur Kreuzpräsentation gezeigt werden (Heit et al., 2004; Schoenberger et al., 1998). Innerhalb der DC-Subpopulation gibt es aber unterschiedlich effektive „Kreuzpräsentierer“. Die Untersuchungen zur Beteiligung der unterschiedlichen Subpopulationen sind Gegenstand der aktuellen Forschung. Es zeichnet sich ab, dass die CD8<sup>+</sup> DC die Population ausmachen, die hauptsächlich für die Kreuzpräsentation verantwortlich ist. Dies geschieht nicht nur durch die direkte Aufnahme von exogenem Antigen, sondern auch durch eine Art Antigenaustausch zwischen CD8<sup>+</sup> DC und anderen DC-Subtypen (Übersichtsartikel (Heath et al., 2004).

### **3.4 DC in Immunität und Toleranz**

Während die Erkennung von pMHC-Komplexen durch unreife T-Zellen im Thymus zu T-Zell-Eliminierung führt, wenn sie mit hoher Affinität gebunden werden (zentrale Toleranz) (Kappler et al., 1987b), führt derselbe Ablauf mit reifen T-Zellen in der Peripherie zu Aktivierung und klonaler Expansion. Daneben existieren Toleranzmechanismen in der Peripherie, die selbstreaktive T-Zellen ausschalten. Tatsächlich hat man Autoimmunität als Ursache von Defekten in der zentralen bzw. peripheren Toleranzinduktion beobachtet, wie z. B. Systemischen Lupus Erythematoses, Multiple Sklerose, Rheumatische Arthritis, Psoriasis oder jugendlicher Diabetes. Periphere Toleranzmechanismen scheinen demnach von essentieller Bedeutung für einen gesunden Organismus zu sein.

### 3.4.1 Zentrale Toleranz

Um unreife autoreaktive T-Zellen (Thymozyten) negativ zu selektionieren, die Autoimmunreaktionen in der Peripherie auslösen könnten, werden ihnen im Thymus Selbstantigene als pMHC-Komplex durch antigenpräsentierende DC präsentiert. Kommt es zu einer starken Interaktion des TCR mit pMHC, wird dieser Thymozyt deletiert. DC präsentieren den Thymozyten sowohl endogene als auch exogene Ag, die durch Phagozytose bzw. Endozytose internalisiert wurden (Heath and Carbone, 2001; Mellman and Steinman, 2001). Neuere Arbeiten von Palmer (Palmer, 2003) schlagen Thymusepithelzellen (engl.: *thymic epithelial cells*, TECs) als potentielle Mediatoren negativer Selektion vor. Interessant ist an TECs, dass sie anscheinend konstitutiv eine Vielzahl von peripheren gewebsspezifischen Ag synthetisieren und exprimieren können. Diese Fähigkeit war anderen Studien zufolge abhängig von der Expression des Autoimmunregulator (engl.: *autoimmune regulator*, AIRE) -Gens (Anderson et al., 2002). Man sollte vermuten, dass durch diese umfangreiche Selektion ein ausreichender Schutz vor potentiell autoreaktiven T-Zellen geschaffen wurde. Warum sind dennoch periphere Toleranzmechanismen unumgänglich? Einerseits ist die Ausübung peripherer Toleranz essentiell für die Nichtbeachtung unzähliger harmloser Ag, die einen Körper tagtäglich aus der Umgebung erreichen (Huang et al., 2000; Mowat, 2003). Des Weiteren scheinen im Thymus trotz der Aktivität von AIRE nicht alle Selbstantigene in ausreichendem Maße exprimiert zu werden oder werden erst später im Leben exprimiert (Matzinger, 1994). Es besteht die Möglichkeit, dass Antigenrezeptoren mit Selbstproteinen kreuzreagieren können. Zudem werden Thymozyten nicht deletiert wenn sie ihr Peptid mit schwacher Avidität binden. Es bleibt alles in allem also die Möglichkeit bestehen, dass potentiell autoreaktive Thymozyten heranreifen und in die Peripherie wandern (Liu et al., 1995; Morgan et al., 1998; Zehn and Bevan 2006).

Neben der negativen Selektion im Thymus scheinen noch andere Mechanismen wie Anergisierung und Bildung von regulatorischen T-Zellen im Thymus (Bensinger et al., 2001; Jordan et al., 2001) zur zentralen Toleranzbildung beizutragen.

### 3.4.2 Periphere Toleranz

Man hat lange vermutet, dass naive T-Zellen nur zwischen Blut, Lymphe und sekundären lymphatischen Organen zirkulieren, nicht aber in nichtlymphatischen Geweben (Mackay, 1993). Bei gesunder Gewebsstruktur würden naive T-Zellen demnach die gewebsspezifischen

Ag gar nicht erst antreffen. Diese so genannte „Ignoranz“ wurde als ein wesentlicher Toleranzmechanismus angesehen, der dafür sorgt, dass es trotz der Präsenz potentiell autoreaktiver T-Zellen in der Peripherie relativ selten zu gewebsspezifischen Autoimmunreaktionen kommt. Ignoranz von naiven T-Lymphozyten aufgrund zu geringer Ag-Menge wurde ebenso nachgewiesen (Kurts et al., 1998b). In einer neueren Arbeit wurde jedoch die Anwesenheit einer T-Zellpopulation von scheinbar naivem Phänotyp entdeckt, die funktionell inaktiv war (Cose et al., 2006). Die Migration naiver T-Lymphozyten scheint daher entgegen der bisherigen Ansicht nichtlymphatische Gewebe einzuschließen. Demnach muss es andere periphere Toleranzmechanismen geben, die Autoimmunität verhindern.

Lange hat man sich mit der Frage beschäftigt, wie DC eine Immunantwort gegen ein Pathogen stimulieren können, nicht aber gegen körpereigene Ag, die in der Peripherie gleichzeitig mit dem Pathogen aufgenommen und prozessiert wurden. Das ist z. B. dann der Fall, wenn DC ganze mit Viren infizierte Zellen aufnehmen. Erst 2001 haben Steinman und Nussenzweig die Hypothese aufgestellt, dass unreife DC vor einer Infektion oder Entzündung (im so genannten „*steady state*“) das immunologische „Selbst“ definieren. Proteine, die von DC im *steady state* aufgenommen und prozessiert werden, sind tolerogen, das heißt Ag-spezifische T-Zellen werden ruhig gestellt. Als Konsequenz daraus konzentriert sich die Immunantwort während einer später auftretenden Infektion auf das Pathogen, nicht aber auf die vorher definierten Selbstantigene oder auf harmlose Ag (Steinman and Nussenzweig, 2002). Das „Ruhigstellen“ der T-Zellen kann folgendermaßen aussehen: DC, die im *steady state* Selbstantigene aus der Peripherie in die Lymphknoten transportieren und naiven T-Zellen präsentieren, sind naiv (engl.: *quiescent*), bzw. exprimieren keine kostimulatorischen Moleküle wie B7.1 und B7.2 (Steinman et al., 2003). Binden T-Zellen ohne Kostimulation durch CD28 ein Ag mit hoher Avidität, ist die T-Zellaktivierung durch verminderte Proliferation und suboptimale Entwicklung von Effektorfunktionen charakterisiert (Hernandez et al. 2001; Kearney et al. 1994). An der Induktion von T-Zell Toleranz sind wohl auch regulatorische Zytokine wie IL-10 beteiligt und der DC-SIGN Rezeptor auf DC, der indirekt für eine effiziente Bindung naiver T-Zellen sorgt (Steinman and Nussenzweig, 2002). Das Endresultat sind Deletion oder Anergie (Kundig et al., 1996; Kurts et al., 1997; Kyburz et al., 1993; Mamalaki et al., 1993; Rocha et al., 1993), wobei Anergie einen Status funktionaler Reaktionslosigkeit beschreibt. Signale, die durch Kostimulation über CD28 weitergeleitet werden, verursachen normalerweise die vermehrte Expression antiapoptotischer Moleküle wie Bcl-xL (Boise et al., 1995). Die Kostimulation von CTL würde außerdem unter kostimulatorischen Bedingungen die Einwanderung in die Peripherie durch eine veränderte Struktur von Adhäsionsmolekülen ermöglichen (Sallusto et al., 1999). Deletion

selbstreaktiver T-Zellen wurde mit anfänglicher Proliferation beschrieben, die etwa eine Woche lang beobachtet wurde, gefolgt von einer Deletion der Mehrheit der spezifischen T-Zellen (Hawiger et al., 2001).

Des Weiteren wurden natürlich vorkommende regulatorische  $CD4^+$   $CD25^+$  T-Zellen beschrieben, die im Rahmen der zentralen Toleranz konstitutiv im Thymus gebildet werden (Fehervari and Sakaguchi, 2004). Die Formierung von regulatorischen T-Zellen ( $T_{reg}$ ) kann ebenso in der Peripherie durch DC induziert werden.  $T_{reg}$  machen weniger als 5% im Blut aus und können T-Zell Antworten auf starke Stimuli supprimieren (Dieckmann et al., 2001; Jonuleit et al., 2001; Levings et al., 2001; Shevach, 2001).

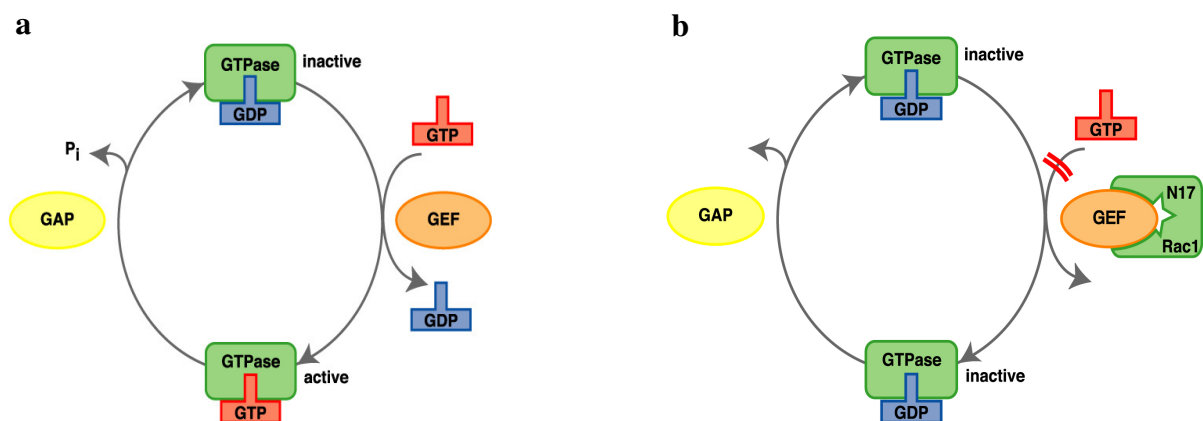
In einer Studie von Curtsinger et al. (Curtsinger et al., 2003) wird vorgeschlagen, dass IL-12 einen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung von Immunität oder Toleranz gegen kreuzpräsentierte Ag hat. Je nachdem, ob  $CD8^+$  DC dazu aktiviert werden, IL-12 oder ein anderes „drittes Signal“ zu produzieren, induzieren sie Immunität (in Abwesenheit von IL-12) oder Toleranz (in Anwesenheit von IL-12).

### 3.5 Regulation von Zellbewegungen in Dendritischen Zellen

DC spielen, wie wir gesehen haben, eine entscheidende Rolle in der Generierung physiologischer Immunantworten und der Aufrechterhaltung peripherer Toleranz (Banchereau and Steinman, 1998). Ein kontrollierter Ablauf dieser Prozesse ist nicht möglich ohne die Chemokin-gelenkte Migration der DC vom Ort, an dem Antigene aufgenommen werden, zu den peripheren Lymphorganen (Kobayashi et al., 2004), der Reifung der DC und der anschließenden erfolgreichen Kommunikation zwischen DC und Lymphozyten (Guermonprez et al., 2002). All die genannten Abläufe werden erst durch die Reorganisation des Zytoskeletts ermöglicht, die zu einem großen Teil von GTPasen der Rho Familie reguliert werden (Etienne-Manneville and Hall, 2002). Cdc42 und Rac1 sind bislang die am besten charakterisierten Rho GTPasen und sind an der Formation des Zytoskeletts während der Migration beteiligt. In einigen Zelltypen sind Rho GTPasen zudem an der Ausübung von Phagozytose beteiligt (Etienne-Manneville and Hall, 2002; Kaibuchi et al., 1999) und am intrazellulären Vesikeltransport (Nobes and Hall, 1995a; Nobes and Hall, 1995b). An *in vitro* Experimenten zeigte man ebenso die Beteiligung der Cdc42 und Rac1 Rho GTPasen an Makropinozytose durch DC (Garrett et al., 2000; West et al., 2000).

Die Rho GTPase Rac1 gehört zu der Ras Superfamilie. Bei den Rho GTPasen handelt es sich

um 20-30 kDa große, monomere Guanosin-Triphosphat- (GTP) bindende und spaltende Proteine, von denen es in Säugetieren mindestens 22 verschiedene gibt (Wherlock and Mellor, 2002). Sie fungieren als molekulare Schalter, welche eine breite Palette von Signaltransduktionswegen in allen eukaryontischen Zellen kontrollieren und damit wichtige zelluläre Prozesse, wie Regulation des Aktin-Zytoskeletts, der Aktivität von Transkriptionsfaktoren und dem Zellzyklus beeinflussen (Bishop and Hall, 2000; Etienne-Manneville and Hall, 2002). Die Aktivität von Rho GTPasen wird durch Signale reguliert, die durch Oberflächenrezeptoren wie die G-Protein gekoppelten Rezeptoren, Tyrosinkinase-Rezeptoren, Zytokinrezeptoren oder Adhäsionsrezeptoren vermittelt werden können. Rho GTPasen wechseln zwischen einem inaktiven, an Guanosin-5'-Diphosphat (GDP) gebundenen und einem aktiven Status, in dem sie an GTP gebunden sind (Boguski and McCormick, 1993; Takai et al., 2001). Das Verhältnis beider Formen zueinander wird einerseits reguliert durch Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (engl.: *guanine nucleotide exchange factors*, GEF), welche als Kofaktoren den Austausch von GDP durch GTP forcieren und dadurch die Rho-GTPasen aktivieren (Kjoller and Hall, 1999; Van Aelst and D'Souza-Schorey, 1997). Andererseits beschleunigen GTPase-aktivierende Proteine (GAP) drastisch die langsame, intrinsische Hydrolyse von GTP zu GDP, was zur Inaktivierung der Rho-GTPase führt (siehe Abb. 3.3) (Lamarche and Hall, 1994; Moon and Zheng, 2003). Intrazelluläre Effektorproteine binden mit hoher Affinität an die aktive Form der Rho GTPase, so dass intrazelluläre Signalkaskaden in Gang gesetzt werden können.



**Abbildung 3.3: Regulation der Aktivität der Rho GTPase Rac1.** Rac1 wechselt zwischen der inaktiven, GDP-gebundenen und der aktiven, GTP-gebundenen Form. Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEF) katalysieren als Kofaktor den Austausch von GDP zu GTP und aktivieren dadurch Rac1. GTPase-aktivierende Proteine (GAP) beschleunigen die Hydrolyse von GTP zu GDP, was Rac1 wieder inaktiviert (a). Die DN Rac1-Mutante Rac1(N17) bindet mit hoher Affinität die für ihre Funktion notwendigen Kofaktoren GEF ohne dabei selbst aktiviert zu werden. Der verursachte Mangel an GEF in der Zelle unterdrückt die Funktion des endogenen Rac1 (b).

In der dominant-negativen (DN) Form des Rac1 der CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> Mäusen liegt ein Aminosäureaustausch der Aminosäure Serin an Position 17 durch ein Asparagin vor. Die dominant-inhibitorische Mutante des Rac1 konkurriert mit dem normalen, endogenen Rac1 um die Bindung an Rac-GEF. Rac1(N17) kann Effektorproteine nicht mit ausreichender Affinität binden und aktivieren. Es bildet sogar so genannte „*dead-end*“ Komplexe, was die Aktivierung endogener Rac1 durch Rac-GEF und damit unter anderem die Reorganisation des Zytoskeletts inhibiert.

Man hatte im Zusammenhang mit Migrationsdefekten in DC aus WAS (Wiskot-Aldrich Syndrom) -Patienten vermutet, dass die Funktion des Zytoskeletts in DC essentiell für die Begründung einer effektiven Immunantwort ist. WAS Patienten zeigen Symptome wie wiederkehrende Infektionen, Tumore und Autoimmunität. Um besser zu verstehen, welche Rolle Rac1 in der Funktion von DC einnimmt, haben Kerksiek et al. eine transgene Maus generiert, in der eine dominant-negative Form des Proteins, Rac1(N17), unter der Kontrolle des DC-spezifischen CD11c-Promotors der Maus steht (siehe 4.1.7.1). Insbesondere wurde an diesem transgenen Mausmodell gezeigt, dass Rac1 in CD8<sup>+</sup> DC eine spezielle Rolle in deren Fähigkeit einnimmt, apoptotische Zellen zu phagozytieren und T-Zellen durch Kreuzpräsentation zu aktivieren. Beides war in CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> Mäusen nach Immunisierung mit zellassozierten Antigenen inhibiert. Während dieses transgene Mausmodell einen geringeren Anteil an CD8<sup>+</sup> DC (etwa 21% CD8<sup>+</sup> von CD11c<sup>+</sup> im Vergleich zu Wildtypmäusen mit etwa 34%) aufweist, ist die Gesamtzahl der DC nicht verändert. Migration und Reifung der DC in CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> Mäusen waren normal (Kerksiek et al., 2005).

### **3.6 Zielsetzung der Arbeit**

Über Kreuzpräsentation hat man in neuerer Zeit viele wichtige Erkenntnisse erhalten. Man versteht heute, dass Kreuzpräsentation einerseits zu Immunität und andererseits zu Toleranz führen kann. Dabei setzt man enorme Hoffnung in das Verstehen von Kreuzpräsentation während der Immunität gegen Tumore, Viren oder intrazelluläre Bakterien oder während der Abstoßungsreaktionen von Transplantaten und eigenen Geweben. Wenn es möglich wäre, Kreuzpräsentation in die eine oder andere Richtung zu modifizieren, könnte dies in medizinischer Hinsicht eine sehr effektive und spezifische Anwendungsmöglichkeit darstellen, um Behandlungsmethoden der genannten Krankheitsbilder und Vakzinierungsmethoden zu optimieren.

Ein mögliches Werkzeug, die Rolle von kreuzpräsentierenden DC in Immunität und Toleranz *in vivo* zu erforschen, könnte die CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> Mauslinie sein, in der die Rho GTPase Rac1 spezifisch inhibiert ist (Kerksiek et al., 2005). In dieser Mauslinie ist durch die DC spezifische Expression der dominant-negativen Form von Rac1 (N17Rac1) die Fähigkeit der CD8<sup>+</sup> DC, apoptotisches Material zu phagozytieren und Kreuzpräsentation von zellulären Ag auszuüben, stark beeinträchtigt.

Die Eignung dieser Mauslinie für Kreuzpräsentationsstudien galt es zunächst genauer zu testen. Als ein geeignetes Modell sollte in dieser Maus die normale Präsentation endogener Ag oder der von Peptiden normal funktionieren, während die Stimulation spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit exogenen Proteinantigenen weniger effektiv sein sollte. Für die Analyse der transgenen Maus wurde zu diesem Zweck das Proliferationsverhalten und die Effektivität von spezifischen exogenen bzw. endogenen CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach Immunisierung mit unterschiedlichen Formen des OVA-Antigens ausgewertet. Verschiedene Wege der Aufnahme von Ag durch DC und deren Auswirkungen auf die Kreuzpräsentation in CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> Mäusen wurden dabei berücksichtigt.

Das Ziel war es anschließend, die Rolle der Kreuzpräsentation in der Entwicklung und Aufrechterhaltung peripherer Toleranz zu untersuchen. Dazu wurde das autoimmune Diabetes-Mausmodell Rip-mOVA mit der CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> Maus gekreuzt, um doppeltransgene Rac/Rip Mäuse zu erhalten. Rip-mOVA Mäuse exprimieren spezifisch in den  $\beta$ -Inselzellen des Pankreas das membrangebundene Modellantigen OVA (mOVA), welches wie Gewebs-Selbstantigene ständig kreuzpräsentiert wird, um Toleranz dagegen auszulösen. So bleiben Rip-mOVA Mäuse normalerweise von einer Diabeteserkrankung verschont. Das Verhalten und die Funktionalität von OVA spezifischen adoptiv transferierten CTL (OT-I Zellen) konnte in Rac/Rip Mäusen anhand von Zellzahlen, Proliferation und Diabetesmessungen zu verschiedenen Zeitpunkten analysiert werden. Aufschluss über die Entwicklung von Anergie oder Toleranz in den OT-I Zellen konnten Auswertungen nach einer Immunisierung mit HSV-OVA geben.

Interessant war schließlich die Frage, ob Kreuzpräsentation auch eine tragende Rolle in der Induktion der zentralen Toleranz spielt. Wenn das der Fall sein sollte, sind möglicherweise selbstreaktive CD8<sup>+</sup> T-Zellen in CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> Mäusen nachweisbar. Um das herauszufinden, wurden T-Zellen aus transgenen Mäusen in Rezipienten mit Thy1.1 Hintergrund transferiert. Die Funktionalität solch potentiell autoreaktiver T-Zellen aus transgenen Mäusen wurde schließlich in Knochenmarkchimären getestet.



## 4 MATERIAL UND METHODEN

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Chemikalien

Alle Lösungen, Medien und Puffer wurden mit zweifach destilliertem Wasser angesetzt. Wenn nicht anders vermerkt, wurden alle Chemikalien von den Firmen Merck (Darmstadt) und Roth (Karlsruhe) im jeweils höchsten Reinheitsgrad bezogen. Die Herkunft speziell benötigter Reagenzien ist in der entsprechenden Methodenbeschreibung angegeben.

#### 4.1.2 Geräte

Brutschrank (Heraeus Hera cell, Kendro Laboratory Products, Hanau), Chemikalienwaage (Kern, Albstadt), Gelelektrophoresesystem (horizontal für Agarosegele (20 x 7 cm), Gelkammer: Eigenbau), Feinwaage (Adventurer, Ohaus Corp., Pine Brooks, NJ, USA), Magnetrührer (Ika Labortechnik, Staufen), pH-Meter (Inolab, Weilheim), Photometer für Küvetten (Biophotometer 6131, Eppendorf, Hamburg), Pipetten (Gilson, Middleton, WI, USA), Pipettierhilfe (Integra Biosciences, Baar, CH), Schüttler (Duomax 1030, Heidolph, Schwabach), Spannungsquelle (EPS 301, Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ, USA), Sterilbank (Heraeus), Thermocycler (T3, Whatman, Biometra, Göttingen), Thermomixer (compact, Eppendorf, Hamburg), Tischzentrifuge (Centrifuge 5415 D, Eppendorf, Hamburg), Ultraschallbad (Bandelin Sonorex Super RK 31, Schalltec, Mörfelden-Walldorf), Vakuumpumpe (KNF Neuberger, Munzingen), Vortex-Genie2 (Scientific Industries, Bohemia, NY, USA), Wasserbad (Grant Instruments Ltd., Barrington Cambridge, England), Zählgerät (Coulter Z2, particle count and size analyzer, Beckman Coulter, Krefeld), Zellseparationssystem (QuadroMACS Separator und MultiStand, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach), Zellsortiergeräte (FACSCalibur und FACS Aria, Becton Dickinson, Heidelberg), Zentrifuge (Rotanta 460R, Hettich, Tuttlingen).

Alle anderen verwendeten Geräte sind in den jeweiligen Methodenbeschreibungen erwähnt.

### 4.1.3 Verbrauchsmaterialien

|   |  |
|---|--|
| Abdichtungsfilm für PCR-Mikroplatten            | Whatman, Clifton, NJ, USA                |
| Diabetesteststreifen (Diabur-Test)              | Roche Diagnostics, Mannheim              |
| Einmal Injektionskanülen 0,45 × 12 mm           | Terumo Medical Corporation, Tokyo, Japan |
| Einmal Injektionskanülen 0,70 × 30 mm           | Braun, Melsungen                         |
| Einmalspritzen                                  | Braun, Melsungen                         |
| Pasteurpipetten, 150 mm                         | Roth, Karlsruhe                          |
| PCR-48 Loch Mikroplatten 0,2 ml                 | ABgene, Hamburg                          |
| Plastik-Petrischalen                            | Roth, Karlsruhe                          |
| Reaktionsgefäße 0,2 ml                          | Nunc, Wiesbaden                          |
| Reaktionsröhrchen 5 ml (FACS)                   | BD Falcon, Lincon Park, NJ, USA          |
| Reaktionsgefäße 15 ml und 50 ml                 | Greiner, Frickenhausen                   |
| Säulen zur Zellseparation, LS                   | MACS, Bergisch Gladbach                  |
| Siebgewebe, 41 µm Porengröße                    | Reichert, Heidelberg                     |
| Siebgewebe, 100 µm Porengröße                   | Franz-Eckert GmbH, Waldkirch             |
| Sterile Skalpellklingen                         | Aesculap, Tuttlingen                     |
| Sterilfilter 0,22 µm Millex <sup>®</sup> -GP    | Millipore, Bedford, MA, USA              |
| Zellsieb ( <i>Cell Strainer</i> ), 100 µm Nylon | BD Falcon, Lincon Park, NJ, USA          |
| 24 Loch-Zellkulturplatten                       | Nunc, Wiesbaden                          |

### 4.1.4 Proteine und Oligonukleotide

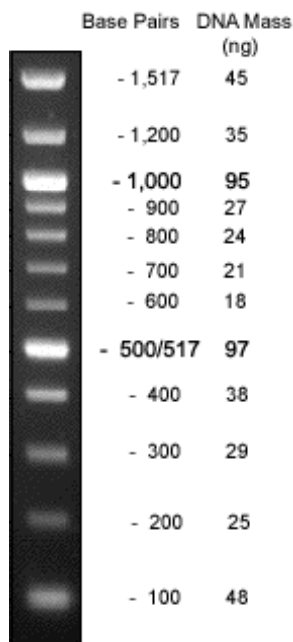
Hühner-Ovalbumin (engl.: *albumin, chicken egg, Grade V*) wurde von der Firma Sigma (St. Louis, MO, USA) bezogen. Das Peptid OVA<sub>257-264</sub> aus Hühner-Ovalbumin mit der Aminosäuresequenz Ser-Ile-Ile-Asn-Phe-Glu-Lys-Leu (SIINFEKL) wurde von der Firma Neosystems (Strasburg, Frankreich) synthetisiert und bezogen. Das Ovalbumin-Peptid

OVA<sub>323-339</sub> mit der Sequenz Ile-Ser-Gln-Ala-Val-His-Ala-Ala-His-Ala-Glu-Ile-Asn-Glu-Ala-Gly-Arg wurde ebenfalls von Neosystems bezogen. DQ Ovalbumin und OVA-Alexa Fluor 647 stammen von Molecular Probes (Leiden, Niederlande).

Die folgenden Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech AG (Ebersberg) hergestellt:

|                     |   |
|---------------------|---|
| #19 (5' CD11c):     | 5'-CCATGGTGATACAAGGGAC-3'               |
| #8706 (3' CD11c):   | 5'-CTCCAAGTTGCTCAGAGC-3'                |
| #18134 (5' RacN17): | 5'-TCGTGAATTCGAGCTCGCCATGGAACAAAACTC-3' |
| #18135 (3' RacN17): | 5'-CGGTGAATTCCTTACAACAGCAGGCATT-3'      |
| Rip-OVA 3':         | 5'-GCAATTGCCTTGTCAGCAT-3'               |
| Rip-OVA 5':         | 5'-CAAGCACATCGCAACCA-3'                 |

#### 4.1.5 DNA-Längenstandard



**Abbildung. 4.1: TriDye 100 bp DNA Längenstandard** (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA). Angegeben wird in der linken Spalte die Länge der DNA-Fragmente in bp und in der rechten deren Masse in ng. Es wurden 0,5 µg (10 µl) des Markers mit einer Konzentration von 50 µg/ml aufgetragen.

### 4.1.6 Pufferlösungen und Medien

|                                |  |
|--------------------------------|--|
| <b>ACK-Puffer</b>              | 8,29 g $\text{NH}_4\text{Cl}$<br>1 g $\text{KHCO}_3$<br>37,2 mg $\text{Na}_2\text{EDTA}$<br>$\text{H}_2\text{O}$ ad 1 l<br>pH 7,2-7,4 mit 1 N $\text{HCl}$ einstellen und durch<br>0,2 $\mu\text{m}$ Filter sterilfiltrieren |
| <b>Boratpuffer</b>             | 0,1 M Borsäure<br>pH 8,5 mit 1 M $\text{NaOH}$ einstellen  |
| <b>CFSE-Färbepuffer</b>        | D-PBS (Gibco, Karlsruhe)<br>0,3 % FBS (v/v) (PAN Biotech, Aidenbach)   |
| <b>FACS-Puffer</b>             | 0,01 % $\text{NaN}_3$ (v/v)<br>2 % FBS (v/v)<br>PBS  |
| <b>MACS-Puffer</b>             | 0,5 % BSA (w/v)<br>2 mM EDTA<br>D-PBS ohne $\text{CaCl}_2$ und $\text{MgCl}_2$ (Gibco,<br>Karlsruhe)   |
| <b>Medium für Gewebeverdau</b> | Zellinkubationsmedium<br>1,67 WünschU/ml Liberase CI (Boehringer<br>Mannheim, Mannheim)<br>200 $\mu\text{g/ml}$ DNase I (Boehringer Mannheim,<br>Mannheim)   |
| <b>PBS</b>                     | 150 mM $\text{NaCl}$<br>10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$<br>2 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$<br>pH 7,4 mit 5 N $\text{NaOH}$ einstellen  |

**PBS/EDTA**

5 mM LPS-freies EDTA (Sigma E-7889,  
Molecular Biology Grade, Seelze)  
PBS

**TAE-Puffer (50x)**

242 g Tris Base  
57,1 ml 96 % Essigsäure (Eisessig) (v/v)  
100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)  
H<sub>2</sub>O ad 1 l

**Zellinkubationsmedium**

Roswell Park Memorial Institute 1640  
(RPMI 1640, Gibco, Aidenbach)  
10 % FBS (inaktiviert, v/v)  
1 % Penizillin/Streptavidin (v/v) (Gibco,  
Karlsruhe)

## 4.1.7 Antikörper

| <i>Spezifität (Anti-Maus-)</i>           | <i>Konjugat</i>                   | <i>Klon</i>                         | <i>Bezugsquelle</i>  |
|--|-----------------------------------|-------------------------------------|--|
| CD4 (L3T4)                               | PerCP<br>APC                      | RM4-5<br>CT-CD4                     | BD Biosciences, Erembodegem, Belgien<br>Caltag, San Francisco, CA, USA   |
| CD8a (Ly-2)                              | PE<br>PerCP<br>APC<br>PacificBlue | 53-6.7<br>53-6.7<br>CT-CD8a<br>5H10 | BD Biosciences, Erembodegem, Belgien<br>BD Biosciences, Erembodegem, Belgien<br>Caltag, San Francisco, CA, USA<br>Caltag, San Francisco, CA, USA |
| CD11b (integrin $\alpha_M$ chain)        | PE<br>APC<br>BIO                  | M1/70<br>M1/70<br>M1/70             | BD Biosciences, Erembodegem, Belgien<br>BD Biosciences, Erembodegem, Belgien<br>BD Biosciences, Erembodegem, Belgien                             |
| CD11c (integrin $\alpha_x$ chain)        | APC                               | HL3                                 | BD Biosciences, Erembodegem, Belgien   |
| CD16/CD32 (Fc $\gamma$ III/II Receptor)  |                                   | 2.4G2                               | BD Biosciences, Erembodegem, Belgien   |
| CD25 (IL-2 Receptor $\alpha$ chain, p55) | FITC<br>PE                        | 7D4<br>PC61 5.3                     | BD Biosciences, Erembodegem, Belgien<br>Caltag, San Francisco, CA, USA   |
| CD43 Activation- Associated Glycoform    | PE                                | 1B11                                | BD Biosciences, Erembodegem, Belgien   |
| CD44 (Pgp-1, H-CAM, Ly-24)               | FITC<br>PE<br>APC<br>BIO          | IM7<br>IM7.8.1<br>IM7<br>IM7.8.1    | BD Biosciences, Erembodegem, Belgien<br>Caltag, San Francisco, CA, USA<br>BD Biosciences, Erembodegem, Belgien<br>Caltag, San Francisco, CA, USA |
| CD45.1 (Ly5.1)                           | FITC<br>PE<br>BIO                 | A20<br>A20<br>A20                   | BD Biosciences, Erembodegem, Belgien<br>BD Biosciences, Erembodegem, Belgien<br>BD Biosciences, Erembodegem, Belgien                             |
| CD45RB                                   | FITC                              | 16A                                 | BD Biosciences, Erembodegem, Belgien   |
| CD62L (L-selectin, LECAM-1, Ly-22)       | APC                               | MEL-14                              | BD Biosciences, Erembodegem, Belgien   |
| CD69 (Very Early Activation Antigen)     | PE                                | H1.2F3                              | BD Biosciences, Erembodegem, Belgien   |
| CD90.1 (Thy-1.1)                         | PE                                | HIS51                               | BD Biosciences, Erembodegem, Belgien   |
| IFN- $\gamma$                            | PE                                | XMG1.2                              | BD Biosciences, Erembodegem, Belgien   |
| H-2Kb MHC Pentamer (Peptid: SIINFEKL)    | PE                                |                                     | ProImmune, Oxford, UK  |
| H-2Kb MHC Pentamer (Peptid: SSIEFARL)    | PE                                |                                     | ProImmune, Oxford, UK  |
| H-2Kb MHC Pentamer (Peptid: TSYKFESV)    | PE                                |                                     | ProImmune, Oxford, UK  |
| H-2Kb/OVA 257-264/m $\beta_2$ m          | PE                                |                                     | Dirk Busch, TU München   |
| rIgG                                     |                                   |                                     | Sigma, Saint Louis, Missouri, USA  |
| rIgG $\alpha$ OVA                        |                                   |                                     | ICN Pharmaceuticals, Aurora, Ohio, USA   |
| V $\alpha$ 2 TCR                         | PE                                | B20.1                               | BD Biosciences, Erembodegem, Belgien   |
| V $\beta$ 5.1,5.2 TCR                    | FITC<br>BIO                       | MR9-4<br>MR9-4                      | BD Biosciences, Erembodegem, Belgien<br>BD Biosciences, Erembodegem, Belgien   |

Tabelle 4.1: Verwendete Antikörper für Durchflusszytometrie

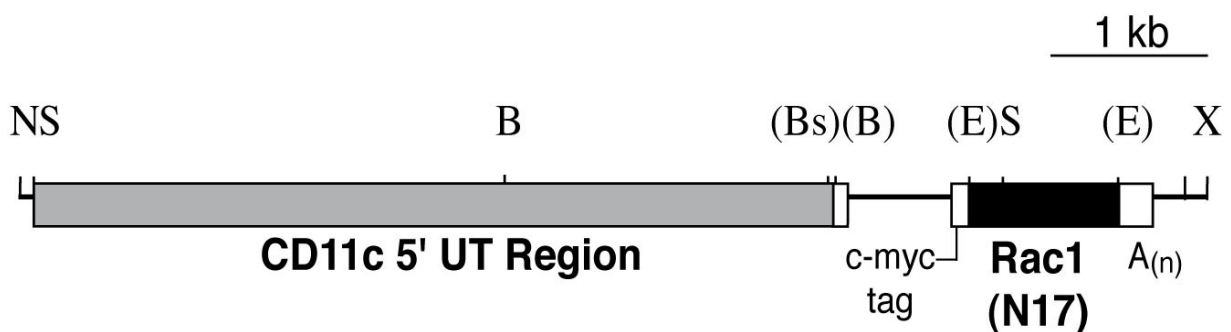
APC- und PE-Cy.7-konjugiertes Streptavidin sowie PE-konjugiertes Rat IgG<sub>1</sub>,  $\kappa$  (Isotypenkontrolle) wurden von der Firma Caltag (San Francisco, CA, USA) bezogen. PerCP-konjugiertes Streptavidin wurde von der Firma BD Biosciences (Erembodegem, Belgien) bezogen.

#### 4.1.8 Versuchstiere

Alle Mäuse wurden in den Tierställen des Instituts für Immunologie in München gehalten. Lediglich BALB.B Mäuse wurden von Charles River (Wilmington, MA, USA) bezogen. Folgende Mausstämme wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet:

##### 4.1.8.1 CD11c-Rac1(N17)

Die hier verwendeten CD11c-Rac1(N17) -transgenen Mäuse wurden vor Beginn dieser Arbeit kreiert. Dazu wurde die dominant negative (DN) Form des Rac1(N17) mittels *EcoRI/HindIII* Restriktionsspaltung aus dem Plasmid pGEM1-Myc-Rac1N17#6 (Guillemot et al., 1997) isoliert. Nach einem sogenannten *blunt ending* mit Klenow Fragment wurde das Transgen Rac1(N17) in die *blunt-ended EcoRI* Schnittstelle des CD11c-pDOI-5 Vektors (Riedinger et al., 1997) kloniert. Die Orientierung der cDNA wurde mittels Restriktionsanalyse und Sequenzanalyse überprüft. Das linearisierte, von Vektorsequenzen befreite, transgene Konstrukt wurde in fertilisierte Oozyten von (BDF1 x BDF1)<sub>F1</sub> Mäusen injiziert. Acht transgene Ausgangslinien (engl.: *founder lines*) wurden mittels *Southern Blot* und PCR identifiziert (Kerksiek et al., 2005). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden, soweit nichts anderes angegeben ist, mit der Ausgangslinie 4038 durchgeführt. Diese wurde zunächst in den C57BL/6 Hintergrund gekreuzt. Für die in dieser Arbeit präsentierten Experimente fanden Mäuse der Generationen F8 bis F16 im Alter von 8-12 Wochen Verwendung.



**Abbildung. 4.2: Schematische Darstellung des transgenen Konstrukts CD11c-Rac1(N17).** B, *Bam*HI; Bs, *Bsr*GI; E, *Eco*RI; N, *Not*I; S, *Sal*I und X, *Xho*I. Die Schnittstellen in Klammern wurden beim *blunt end* Verdau entfernt. Rac1 (N17): In Rac1 wurde die Aminosäure Serin (S) durch Asparagin (N) ausgetauscht.

### 4.1.8.2 Rip-mOVA

Erstmals beschrieben wurde diese Mauslinie von (Kurts et al., 1996). Die membrangebundene Form des Ovalbumin (mOVA) besteht hier aus einem Fusionsprotein der ersten 118 Aminosäuresequenzen des humanen Transferrin-Rezeptors. Diese Sequenz enthält das zytoplasmatische Ende sowie eine Signalsequenz und ist an die Aminosäuresequenz 139-385 des reifen Ovalbumin gekoppelt. Die für mOVA codierende cDNA wurde aus dem Plasmid pSVT7-OVA/TfR (Teasdale et al., 1992) geschnitten und anschließend in den pBlueRIP Vektor (Barrett et al., 1995) kloniert. Somit wurde mOVA unter die Kontrolle des Ratten-Insulinpromotors (engl.: *rat insulin promotor*, RIP) gebracht. Die Vektorsequenzen wurden schließlich in Pronuklei C57BL/6-fertilisierter Oozyten mikroinjiziert. Unter Kontrolle des Ratten-Insulinpromotors exprimieren Rip-mOVA Mäuse Ovalbumin als Autoantigen in Pankreas, Niere und Thymus.

### 4.1.8.3 OT-I und OT-II

Der T-Zell Rezeptor (engl.: *T cell receptor*, TCR) der transgenen Mauslinie OT-I wird von (Hogquist et al., 1994) erstmalig beschrieben. Sie ist transgen für einen TCR, der das Peptid OVA<sub>257-264</sub> im Kontext von MHC-Klasse I H-2K<sup>b</sup> erkennt. Der TCR kann spezifisch mit den mAb anti-Maus *Va2* und *Vb* 5.1, 5.2 TCR nachgewiesen werden. 90 % aller T-Zellen in diesen Mäusen tragen den transgenen Rezeptor, da durch das Transgen die Umlagerung weiterer T-Zell-Rezeptorgene verhindert wird. Dieser Mausstamm wurde sowohl in C57BL/6 (OT-I in Ly5.2) als auch in B6SJL-Hintergrund (OT-I in Ly5.1) gezüchtet. Für den adoptiven Transfer von OT-I Zellen in Mäuse mit C57BL/6 Hintergrund wurden, soweit nichts anderes angegeben ist, zur besseren Unterscheidung von endogenen und exogenen T-Zellen OT-I Zellen in Ly5.1 Hintergrund verwendet.

Der TCR der OT-II Zellen erkennt das Peptid OVA<sub>323-339</sub> im Kontext von MHC-Klasse II I-A<sup>b</sup>. Der TCR kann spezifisch mit den oben genannten Ak nachgewiesen werden.

### 4.1.8.4 C57BL/6 sowie C57BL/6 Thy1.1 und C57BL/6 Ly5.1 (B6SJL)

Der MHC-Haplotyp dieser Mausstämmen ist H-2<sup>b</sup>. C57BL/6 Mäuse exprimieren das Ly5.2 Allel für CD45 und das Thy1.2 Allel für CD90. Der kongene Mausstamm B6SJL ist bis auf das Ly5.1 Allel genetisch identisch zu C57BL/6. C57BL/6 Thy1.1 wurden von J. Kirberg



(MPI, Freiburg, Deutschland) bezogen und exprimieren das Thy1.1 Allel von CD90. Mit anti-CD90.2 bzw. anti-CD45.1 Antikörpern konnten somit adoptiv transferierte T-Zellen in C57BL/6 Thy1.1 bzw. C57BL/6 Ly5.1 Rezipienten nachgewiesen werden.

#### **4.1.8.5 BALB.B (C.B10-H2<sup>b</sup>/LilMcdJ)**

Die BALB/B Mauslinie ist von Dr. Frank Lilly (Freedman and Lilly, 1975) entwickelt worden. Dabei wurde BALB/c (BALB/cLilMcdJ) mit C57BL/10 (C57BL/10J) gekreuzt. Nach 13 Rückkreuzungen mit Selektion nach H2<sup>b</sup> wurde diese Mauslinie untereinander weiterverpaart (engl.: *intercross*). Der MHC-Haplotyp dieser Mausstämme ist H-2<sup>b</sup> wie in C57BL/6 Mäusen. Jedoch unterscheidet sich die BALB/B Mauslinie von den C57BL/6 Mäusen in mehr als 29 mHAgS (engl.: *minor histocompatibility antigens*) (Friedman et al., 1998).

#### **4.1.9 Virale Vektoren**

Der replikationsdefiziente, rekombinante HSV-1-Vektor HSV-OVA wurde im Labor von P. Marconi (Universität Ferrara, Italien) konstruiert und hergestellt. Das Konstrukt basiert auf dem Vektor T0ZGFP (Krisky et al., 1997). In diesem Vektor wurden die essentiellen *immediate early*-Gene ICP4, ICP27 und das Gen ICP22 deletiert. Die Expressionskassette hCMV- $\beta$ -Globin-OVA wurde in den UL41-Lokus inseriert (Lauterbach et al., 2004).

Das rekombinante Vacciniavirus MVA-OVA wurde freundlicherweise von G. Sutter (GSF, Neuherberg) zur Verfügung gestellt.

### 4.2 Methoden

#### 4.2.1 Molekularbiologische Methoden

##### 4.2.1.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese (Sambrook, 1989) diente der Auftrennung und Identifizierung von DNA-Fragmenten. Es wurden Horizontalgele verwendet, die 1,5 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer enthielten. Der flüssigen Agaroselösung wurde zur späteren Analyse der DNA-Banden mit UV-Licht (312 nm) 1/30.000 Volumen einer Ethidiumbromid-Stammlösung (10 mg/ml) zugesetzt. Als Längenstandard wurde die TriDye 100 bp DNA-Leiter (Abb. 4.1) verwendet. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte bei einer konstanten Spannung von 70 V in einer Elektrophoresekammer (Eigenbau) mit 1×TAE als Laufpuffer. Nach der Elektrophorese wurden die Gele mit einem Geldokumentationssystem (Intas, Göttingen) fotografiert.

##### 4.2.1.2 Bestimmung der Protein-Konzentration

Die Bestimmung von Protein wurde direkt photometrisch im Biophotometer durchgeführt. Die Protein-Konzentration wurde über die Warburg-Formel (programmiert) folgendermaßen berechnet und in µg/ml angezeigt:  $C = (1,55 \times E_{280} - 0,76 \times E_{260}) \times 1000$ . Für die Messung wurden UV-Mikroküvetten mit einer Schichtdicke von 10 mm und einer Zentrumsbreite von 8,5 mm (Brand, Wertheim) verwendet. Zur Bestimmung des Nullwertes (engl.: *blank*) wurde jeweils der gleiche Puffer verwendet, der auch für die Lösung des Proteins verwendet wurde.

##### 4.2.1.3 Isolierung genomischer DNA aus Gewebebiopsien

Die Gewebeproben, hier Schwanzspitzen, wurden mit einem sterilen Skalpell in 1-2 mm große Stücke geschnitten. Das blutige Anfangsstück wurde dabei verworfen, um Kontaminationen mit Blut anderer Mäuse zu vermeiden. Die Gewebeprobe wurde zusammen mit 100 µl sterilem H<sub>2</sub>O in ein Reaktionsgefäß gegeben. Der Ansatz wurde für 10 min bei 95°C inkubiert, um endogene Peptidasen zu inaktivieren und anschließend kurz zentrifugiert. Dann wurden 2 µl Proteinase K (2 mg/ml) zugegeben und mit dem Ansatz vermischt. Während einer etwa zwölfstündigen Inkubation bei 54°C im Wasserbad wurde das

Schwanzstück verdaut. Vor Verwendung der freigesetzten genomischen DNA wurde die Proteinase K durch eine zehnminütige Inkubation bei 95°C inaktiviert. Anschließend wurde ein Aliquot der DNA direkt für einen PCR-Ansatz verwendet.

#### 4.2.1.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (engl.: *polymerase chain reaction*, PCR) (Mullis et al., 1986) wurden spezifische DNA-Sequenzen amplifiziert, um Transgene in CD11c-Rac1(N17)-Mäusen und Rip-mOVA x CD11c-Rac1(N17)-Mäusen (= Rac/Rip) nachzuweisen. Durch die Verwendung jeweils zweier spezifisch bindender Oligonukleotid-Primer, die die zu amplifizierende Sequenz flankieren, lassen sich spezifische DNA-Bereiche enzymatisch vervielfältigen. Durch mehrere aufeinander folgende temperaturabhängige Denaturierungs-, Primeranlagerungs- und Polymerisationsschritte kommt es zu einer exponentiellen Zunahme des gewünschten Fragments, dessen Enden durch die Primer festgelegt sind. Die DNA-Polymerisation erfolgt durch eine hitzestabile DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* (Chien et al., 1976).

##### PCR-Reaktionsbedingungen für CD11c

In dieser PCR wird eine ca. 200 bp lange Sequenz (Abb. 4.3) amplifiziert, die Teile des CD11c-Promotors enthält.

0,1 µl Primer #19 (100 pmol/µl)

0,1 µl Primer #8706 (100 pmol/µl)

12,5 µl ReddyMix\*

2 µl DNA

H<sub>2</sub>O ad 25 µl

\*2 x ReddyMix PCR Master Mix (1,5 mM MgCl<sub>2</sub>) von ABgene, Epsom, Surrey, UK. In diesem Mix sind pro 25 µl Endvolumen enthalten: 0,63 U Thermoprime Plus DNA Polymerase, 75 mM Tris-HCl (pH 8,8 bei 25°C), 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,01 % (v/v) Tween 20, je 0,2 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP, ein roter Farbstoff und ein Fällungsmittel für die Gelelektrophorese.

Die Amplifikation des DNA-Fragments erfolgte im T3-Thermocycler mit Hilfe des folgenden Programms:

95°C 5 min.

30 Zyklen: 95°C 30 s., 53°C 30 s., 72°C 30 s.

1 Zyklus: 72°C 10 min.

4°C

### PCR-Reaktionsbedingungen für Rac1(N17)

Hier wird eine ca. 600 bp lange Sequenz (Abb. 4.3) amplifiziert, die Teile des Rac1(N17)-Gens enthält. Je nach Anzahl der inserierten Rac(N17)-Kopien erhält man im Gel unterschiedlich dicke Banden.

0,1 µl Primer #18134 (100 pmol/µl)

0,1 µl Primer #18135 (100 pmol/µl)

12,5 µl ReddyMix

2 µl DNA

H<sub>2</sub>O ad 25 µl

Programm:

95°C 5 min.

30 Zyklen: 95°C 30 s., 55°C 45 s., 72°C 30 s.

1 Zyklus: 72°C 10 min.

kühlen

### PCR-Reaktionsbedingungen für Rip-mOVA

In dieser PCR wird eine ca. 500 bp lange Sequenz (Abb. 4.3) amplifiziert.

0,1 µl Primer #Rip-OVA3' (100 pmol/µl)

0,1 µl Primer #Rip-OVA5' (100 pmol/µl)

12,5 µl ReddyMix

2 µl DNA

H<sub>2</sub>O ad 25 µl

Programm:

95°C 5 min.

30 Zyklen: 95°C 30 s., 53°C 30 s., 72°C 30 s.

1 Zyklus: 72°C 10 min.

kühlen

Die Schmelztemperatur ( $T_M$ ) (Wallace, 1979) und die Anlagerungstemperatur ( $T_A$ ) wurden mittels folgender Formel berechnet:

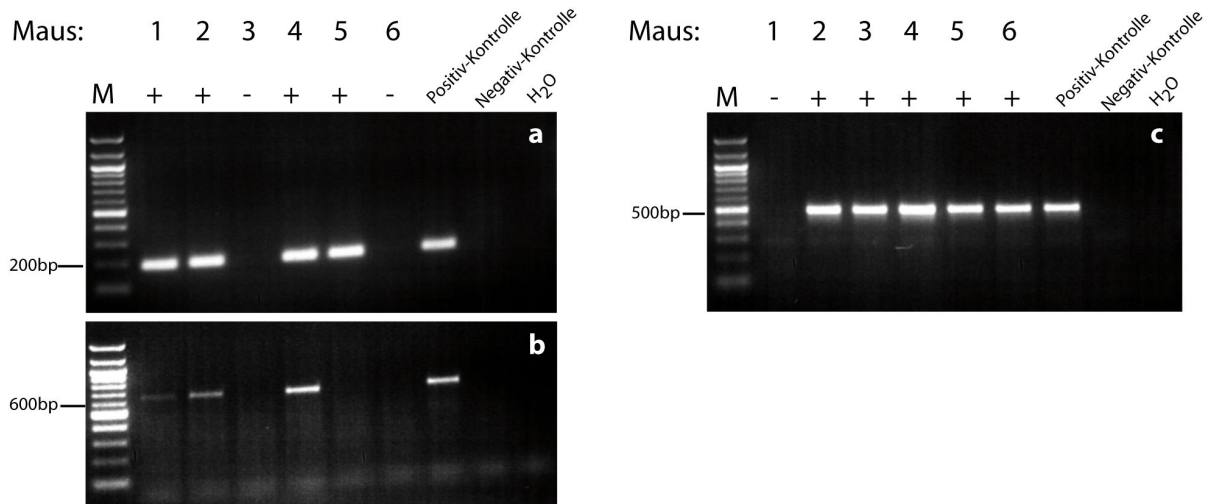
$$T_M = [(G+C) \times 4^\circ\text{C}] + [(A+T) \times 2^\circ\text{C}]$$

$$T_A = T_M - 5^\circ\text{C}$$

#### 4.2.1.5 Genotypisierung genomischer DNA

Da CD11c-Rac1(N17)  $Tg^+$  Mäuse heterozygot für die Rac1(N17) Mutante sind, wurden die Tiere vor Verwendung genotypisch charakterisiert (siehe 4.2.1.3 und 4.2.1.4). Es bestehen zwei Möglichkeiten, das Transgen in diesen Tieren nachzuweisen. Eine besteht darin, eine PCR durchzuführen, in der beide Primer im Rac Transgen binden („Rac PCR“). CD11c-Rac1(N17)  $Tg^+$  Mäuse konnten mit dieser PCR anhand eines spezifischen 600 bp großen Amplifikats identifiziert werden. Bei  $Tg^-$  Mäusen sowie bei der Negativkontrolle konnte nur ein unspezifischer Hintergrund detektiert werden, der durch die enthaltenen Oligonukleotide sowie genomische DNA zustande kam (Abb. 5.1 a). Eine zweite Möglichkeit, das Transgen nachzuweisen ist eine PCR, mit der eine etwa 200 bp lange Sequenz nachgewiesen wird, die Teile des CD11c Promotors enthält (Abb 5.1 b).

Ebenso wurden die heterozygoten Rip-mOVA Mäuse, die für die Zucht von Rac/Rip Mäusen verwendet wurden, auf deren Transgen hin untersucht (siehe PCR-Bedingungen 4.2.1.4). Rip-mOVA Mäuse konnten mit PCR anhand eines spezifischen 500 bp großen Amplifikats identifiziert werden (Abb. 5.1 c). Aus der Verpaarung von CD11c-Rac1(N17)  $Tg^+$  mit Rip-mOVA Mäusen resultierende doppeltransgene Mäuse (z.B. Maus vier) wurden auf beide Transgene hin untersucht. Nur Mäuse, die in allen drei PCRs spezifische Amplifikate aufwiesen, wurden für Versuche zur Toleranzentwicklung (Abschnitt 5.2) verwendet.



**Abbildung. 4.3: Repräsentatives Beispiel einer DNA-Agarose-Gelelektrophorese von PCR-Amplifikaten zur Maus-Genotypisierung.** (a) CD11c-PCR. DNA Fragmente einer Länge von ca. 200 bp wurden amplifiziert. (b) Rac-PCR. DNA Fragmente einer Länge von ca. 600 bp wurden amplifiziert. (c) Rip-mOVA-PCR. DNA Fragmente einer Länge von ca. 500 bp wurden amplifiziert. Mit + gekennzeichnete Banden sind positiv für das jeweilige Transgen. M = DNA-Leiter. Maus 1 ist z. B. positiv für CD11c-Rac1(N17) aber negativ für Rip-mOVA. Die DNA-Bande des Rac-Amplifikats von Maus 5 fällt so schwach aus, dass sie nur auf dem Agarosegel direkt sichtbar war.

### 4.2.2 Zell- und immunbiologische Methoden

#### 4.2.2.1 Lymphozytenanreicherung aus peripherem Blut

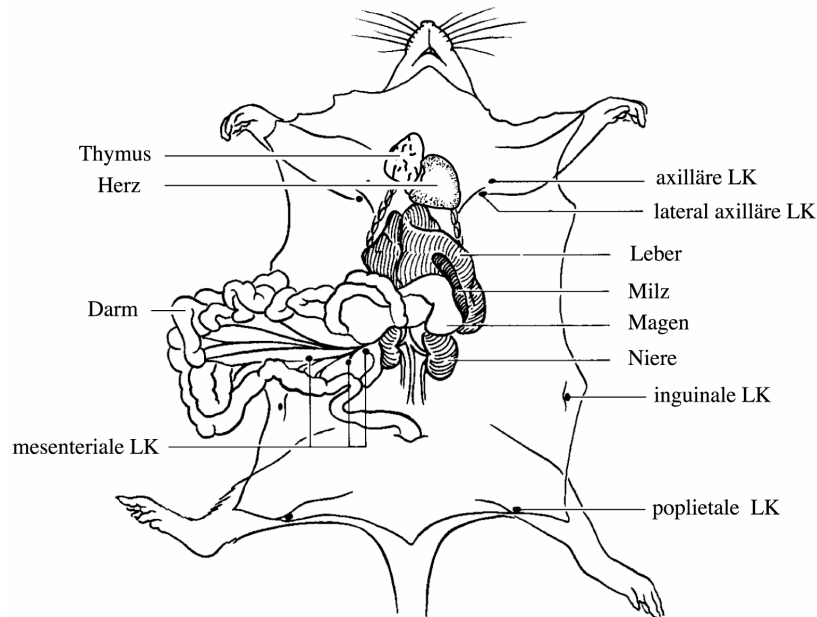
Für die Blutabnahme wurde die Maus unter einer Infrarotlampe erwärmt. Dies führte zur Weitung der Blutgefäße (Vasodilatation) und somit zur Förderung der Durchblutung. Durch einen Schnitt in die untere Schwanzvene wurden der Maus einige Tropfen (ca. 100 bis 200 µl) Blut entnommen und sofort mit ca. 50 µl Heparin-Natrium (25000 I.E./5 ml, Ratiopharm, Ulm) vermischt, um die Blutgerinnung zu verhindern. 100 oder 200 µl dieser Blutsuspension wurden in ein frisches 5 ml FACS-Röhrchen überführt und mit dem gleichen Volumen doppelt konzentriertem Antikörper-Mix in FACS-Puffer inkubiert. Um die Erythrozyten aus der Blutsuspension zu entfernen, wurden diese anschließend mit Pharm Lyse Puffer (BD Biosciences, Pharmingen, Erembodegem, Belgien) lysiert. Zu diesem Zweck wurde nach Hinzufügen von 2 ml Lysepuffer sofort gevortext und die Suspension wurde für 15 min bei RT inkubiert. Da Erythrozyten eine Natrium-Kalium-Pumpe fehlt, können diese die einströmenden Ionen nicht mehr aus der Zelle befördern. Um den osmotischen Druck

auszugleichen, strömt Wasser in die Zellen und bringt diese dadurch zum Platzen. Nach der Lyse wurde die Zellsuspension mit 2 ml FACS Puffer verdünnt und es folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 1200 UpM und 4°C. Der Überstand wurde bis auf 100 µl abgesaugt und das Pellet im Restvolumen resuspendiert und auf Eis gelagert.

#### **4.2.2.2 Organentnahme und Herstellung einer Einzelzellsuspension**

##### **4.2.2.2.1 Lymphknoten und Milz**

Zur Organentnahme wurde die Maus mittels zervikaler Dislokation getötet, äußerlich mit 70-prozentigem Ethanol desinfiziert und auf einem Sezierbrett fixiert. Die Lage der Lymphknoten kann Abb. 4.4 entnommen werden. Sie wurden mit feinen Pinzetten entnommen und bis zur weiteren Verwendung in Puffer auf Eis gelagert. Die Milz befindet sich in der linken mittleren Bauchhälfte und ist ein längliches, dunkelrotes Organ. Sie kann mit einer feinen Schere herausgelöst und in Puffer auf Eis gelagert werden. Bei allen Organentnahmen sollte darauf geachtet werden, das Fett zu entfernen, da dies bei der späteren Verarbeitung zu viele Zellen bindet. Zur Herstellung einer Einzelzellsuspension wurden die Organe in einer Petrischale (Ø 5 cm) in etwas Puffer zwischen zwei Gazestückchen (Franz Eckert GmbH, Waldkirch, Porengröße 100 µm) mit dem Stempel einer Injektionsspritze zerrieben. Die Zellsuspension wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei 1200 UpM und 4°C für 5 min zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen je nach weiterer Verwendung im gewünschten Puffer oder Medium suspendiert. Die aus der Milz gewonnene Zellsuspension wurde anschließend einer Erythrozytenlyse (4.2.2.3) unterzogen. Wurden gewonnene Zellen für einen adoptiven Zelltransfer benötigt, wurde statt FACS-Puffer 1 % FBS (v/v) in PBS oder MACS-Puffer verwendet.



**Abbildung. 4.4:** Lage der wichtigsten Organe der Maus Quelle: (Reeves, 2001), verändert.

### 4.2.2.2 Herstellung einer Einzelzellsuspension mit Dendritischen Zellen

Bei der eben beschriebenen Vorgehensweise werden DC der Organe nur in geringerem Maße in die Suspension überführt. Sie reagieren zudem besonders empfindlich auf den mechanischen Druck, der durch das beschriebene Zerreiben entsteht. Ist es notwendig bei den Untersuchungen DC mit einzubeziehen, kann das Organ diesem Zweck entsprechend jedoch auch anders verarbeitet werden.

Die herauspräparierte Milz wurde in 5 ml RPMI Medium auf Eis gehalten. Pro Milz wurden 2 ml Medium für Gewebeverdau hergestellt. Während die Milz mit einer Pinzette über ein 15 ml Reaktionsgefäß gehalten wurde, wurden 2 ml Medium injiziert (0,45 x 12 mm Injektionskanüle) und die Milz dabei mehrmals mit der Kanüle durchlöchert. Die Milz wurde anschließend in das Reaktionsgefäß gegeben und in dem Gewebeverdau-Medium für 20-30 min bei 37°C inkubiert. Die Zellsuspension wurde nun durch ein Zellsieb gefiltert, das auf ein 50 ml Reaktionsgefäß platziert wurde. Die verdaute Milz wurde im Zellsieb mit PBS/EDTA gewaschen, um die Aktivität der im Medium enthaltenden Enzyme zu inhibieren. Wenn nötig, wurden die restlichen Milzzellen durch sehr sanftes Reiben der Milz mit dem Stempel einer Injektionsspritze herausgelöst. Es folgte das Waschen des Zellsiebes mit PBS/EDTA und eine



Zentrifugation für 5 min bei 1200 UpM und 4°C. Das Zellpellet wurde je nach Weiterverarbeitung in Zellkulturmedium, FACS- oder MACS-Puffer resuspendiert.

#### **4.2.2.3 Erythrozytenlyse in der Milzzellsuspension**

Um die Erythrozyten aus einer Milzzellsuspension zu entfernen, wurde diese in 4 ml ACK Puffer suspendiert und 4 min bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Zellsuspension mit 10 ml FACS Puffer verdünnt und bei 1200 UpM und 4°C für 5 min zentrifugiert und anschließend der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde in Puffer oder Medium resuspendiert und auf Eis gelagert. Auch hier lysieren die Erythrozyten aufgrund der fehlenden Natrium-Kalium-Pumpen.

#### **4.2.2.4 Bestimmung der Zellzahl**

Die Zellzahl wurde mit Hilfe eines Zellzählgerätes Coulter Z2 (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA) bestimmt. Die Arbeitsmethode dieses Gerätes basiert auf der messbaren Veränderung des elektrischen Widerstandes, die von einer Zelle ausgelöst wird, die in einem Elektrolyt suspendiert ist und eine Kapillaröffnung zwischen zwei Elektroden passiert. Die Höhe des ausgelösten elektrischen Impulses ist dabei proportional zu dem Volumen der Zellen, wohingegen die Anzahl der Impulse die Zahl der aufgenommenen Zellen wiedergibt. Durch Zugabe von Zap-O-Globin (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA) werden nur lebende Zellen gezählt.

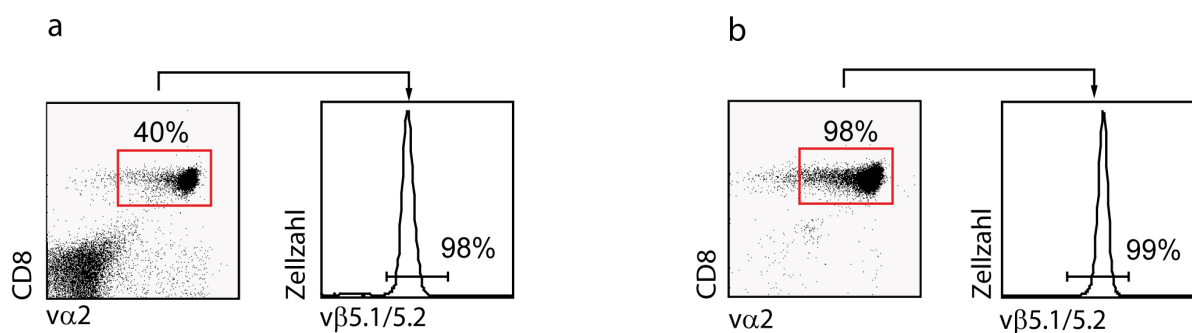
#### **4.2.2.5 Positive Selektion von T-Zellen aus einer Zellsuspension (MACS)**

Die magnetische Zellseparation (engl.: *magnetic cell separation*, MACS, Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach) beruht auf der Separation von Zellen mit spezifischen Antikörpern, die mit paramagnetischen Partikeln (MACS-*Microbeads*) gekoppelt sind. Die Zellseparation erfolgt mit Hilfe einer Säule, die in ein starkes Magnetfeld platziert wird. Nur die magnetisch markierten Zellen werden dadurch in der Säule zurückgehalten, während die nicht markierten Zellen durchfließen. Sobald die Säule aus dem Magnetfeld herausgenommen wird, können die magnetisch markierten Zellen eluiert werden. In dieser Arbeit fand, soweit nichts anderes

vermerkt ist, die negative Selektion Anwendung, um eine mögliche Stimulierung der T-Zellen zu vermeiden.

Für die negative Selektion von  $CD4^+$  bzw.  $CD8^+$  T-Zellen wurde der  $CD8a^+$  bzw.  $CD4^+$  *T Cell Isolation Kit* verwendet, mit dem alle nicht- $CD4^+$  bzw. alle nicht- $CD8^+$  T-Zellen depletiert werden. In einem ersten Arbeitsschritt findet ein Gemisch aus biotinkoppelten Antikörpern Verwendung, das diese unerwünschten Zellen markiert. In einem zweiten Schritt werden die biotinkoppelten Antikörper mit streptavidinkoppelten *Microbeads* markiert. Im magnetischen Feld der MACS-Separatoren können nun die unberührten  $CD4^+$  bzw.  $CD8^+$  T-Zellen durch die MACS-Säule fließen, während alle anderen Zellen an ihr haften bleiben. Die Separation aller T-Zellen erfolgte sinngemäß mit dem *Pan-T Cell Isolation Kit*.

Es wurden nur entgaste Puffer verwendet. Die Suspensionen wurden mit 5  $\mu$ l biotinkoppelten Antikörpern und 40  $\mu$ l MACS-Puffer pro  $10^7$  Zellen für 10 min im Kühlschrank inkubiert. Ohne zusätzlichen Waschschrift wurden die Suspensionen anschließend mit 10  $\mu$ l Anti-Biotin *Microbeads* und 30  $\mu$ l MACS-Puffer pro  $10^7$  Zellen für 15 min im Kühlschrank inkubiert. Die Zellen wurden mit dem 20-fachen Volumen MACS-Puffer gewaschen. Um Zellaggregate zu entfernen, wurden die Zellen durch ein Nylonnetz (Porengröße 100  $\mu$ m, Reichelt Chemie Technik) filtriert, bevor sie auf die gemäß den Angaben des Herstellers äquilibrierte Säule gegeben wurden. Maximal  $2 \times 10^8$  Zellen pro 500  $\mu$ l wurden auf eine  $LS^+$  Säule aufgetragen, welche in einem Magneten befestigt war. Die Zellen wurden mit  $3 \times 3$  ml MACS-Puffer gewaschen. Die durchgeflossenen Zellen wurden als positive Fraktion gesammelt. Anschließend wurde die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und die Zellen als negative Fraktion mit 5 ml MACS-Puffer eluiert.



**Abbildung. 4.5:** FACS-Analyse von Lymphozyten vor (a) und nach (b) einer Lymphozytenseparation mit einem MACS-CD8 T-Zell Isolierungs Kit. a) Lymphozyten vor einer Zellseparation. 40 % aller lebenden Zellen sind positiv für CD8 und  $v\alpha 2$ . b) Nach einer Zellseparation sind 98% der Lymphozyten positiv für diese Marker.

#### 4.2.2.6 Positive Selektion von Dendritischen Zellen aus einer Zellsuspension (MACS)

CD11c wird in Mäusen auf allen Subtypen von DC exprimiert. Zur Isolation dienten hier CD11c (N418) *Microbeads*. Im magnetischen Feld der MACS-Separatoren blieben die CD11c-positiven Zellen an der MACS-Säule haften und konnten später eluiert werden.

Die Lymphozyten-Suspension wurde mit 100 µl CD11c (N418) *Microbeads* und 400 µl MACS-Puffer pro  $10^8$  Zellen für 15 min im Kühlschrank inkubiert. Die Zellen wurden mit 2 ml MACS-Puffer pro  $10^8$  Zellen gewaschen. Maximal  $10^8$  Zellen pro 500 µl wurden auf eine LS<sup>+</sup> Säule aufgetragen. Die durchgeflossenen Zellen wurden als negative Fraktion verworfen, die Säule wurde aus dem Magnetfeld entfernt und die positive Zell-Fraktion mit 5 ml MACS-Puffer eluiert. Des Weiteren gelten die in 4.2.2.5 genannten Ausführungen.

#### 4.2.2.7 Färbung von Lymphozyten mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper

Zu 50-100 µl Zellsuspension wurde das gleiche Volumen kalter FACS Puffer zugegeben, indem Antikörper entsprechend vorverdünnt wurden. Die Suspension wurde gemischt und für 20 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen, um ungebundenen Antikörper zu entfernen. Falls notwendig, wurde nun eine Färbung mit einem sekundären Antikörper oder Reagens wie z.B. Streptavidin durchgeführt. Nach dem letzten Waschschrift verblieben ca. 100 µl in dem Reaktionsgefäß. Die Zellen wurden mit 1-2 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert und bis zur durchflusszytometrischen Analyse bei 4°C aufbewahrt.

#### 4.2.2.8 Intrazelluläre Zytokinfärbungen in T-Zellen

Um die Zytokinproduktion von T-Zellen nachzuweisen, müssen diese nach der Isolierung *in vitro* restimuliert werden. Hierbei werden jedoch keine naiven T-Zellen aktiviert, sondern nur schon voraktivierte Zellen zur Zytokinproduktion angeregt.

Brefeldin A (Intracellular staining Kit, BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) inhibiert den Golgi-Transport und somit die Zytokinsekretion und führt so zu einer Anhäufung der Zytokine in der Zelle. Für eine intrazelluläre Färbung müssen die Zellwände der Zellen permeabilisiert werden, damit die Antikörper für die intrazelluläre Zytokinfärbung in die Zelle eindringen können. Damit die Zellen nach Permeabilisierung der Zellwand nicht auslaufen und absterben, werden die Zellen mittels Paraformaldehyd fixiert.

Die Einzelzellsuspension einer Milz aus einer immunisierten Maus wurde in Zellmedium mit  $10^{-6}$  M Peptid in Gegenwart von 1  $\mu$ l Brefeldin A/ml für 5 h bei 37°C und 5 % CO<sup>2</sup> in einer 24-Lochplatte inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet, einmal mit FACS-Puffer gewaschen und die Oberflächenmarker mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern in 5 ml Reaktionsröhrchen gefärbt. Die Zellen wurden anschließend mit 250  $\mu$ l Cytoperm Lösung/Röhrchen (Intracellular staining Kit, BD Pharmingen) für 20 min bei 4 °C fixiert. Um die Zellmembran für den intrazellulären Antikörper permeabel zu machen, wurden die Zellen einmal mit 1 ml Perm/Wash Puffer (Intracellular staining Kit, BD Pharmingen) gewaschen. Die Zellen wurden anschließend mit den Fluorochrom-konjugierten intrazellulären Antikörpern für 30 min bei 4°C im Dunkeln in 96-Lochplatten gefärbt. Die intrazellulären Antikörper wurden in Perm/Wash Puffer vorverdünnt, um die Permeabilität der Zellmembran aufrecht zu halten. Die Zellen wurden noch drei mal in 250  $\mu$ l Perm/Wash Puffer gewaschen (3 min, 300 g, 4°C), mit 1-2 % PFA fixiert und bis zur FACS-Analyse bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

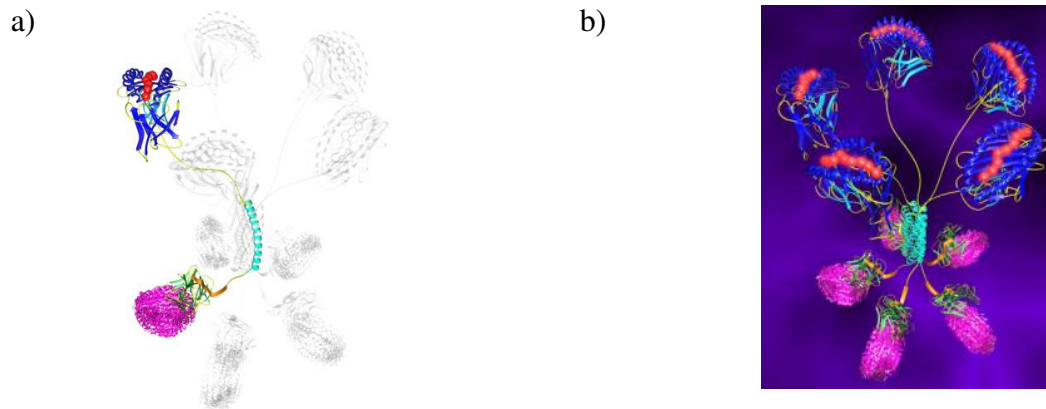
Um intrazellulär exprimierte Proteine nachweisen zu können, wurden oberflächenmarkierte Zellen fixiert und permeabilisiert. Den fluorochrommarkierten Antikörpern wurde auf die Weise Zugang zum stabilisierten Zellinneren verschafft.

Dazu wurde die Zellsuspension bei 1200 UpM und 4°C für 5 min zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in 200  $\mu$ l *Cytofix/Cytoperm*-Puffer (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) aufgenommen und für 20 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen mit *Perm/Wash*-Puffer (BD Pharmingen) gewaschen. Die intrazelluläre Färbung erfolgte mit einem in *Perm/Wash*-Puffer entsprechend vorverdünnten Antikörper für 20 min auf Eis. Nach Entfernung ungebundener Antikörper in einem weiteren Waschschriff wurde, falls notwendig, eine Färbung mit einem sekundären Antikörper oder Reagens durchgeführt. Nach dem letzten Waschschriff wurden die Zellen in 250  $\mu$ l FACS-Puffer aufgenommen.

### 4.2.2.9 Nachweis Antigen-spezifischer T-Zellen mittels Pentameren

Endogene, polyklonale T-Zellpopulationen, die als Immunantwort auf eine Immunisierung expandieren, besitzen ein diverses TCR-Repertoire. Um Epitop-spezifische T-Zellen zu detektieren, kann der spezielle Ligand des jeweiligen TCR, der MHC-Peptid (Epitop)-Komplex eingesetzt werden. Wird dieser Komplex an ein Fluorochrom konjugiert, sind die Antigen-spezifischen T-Zellen nach Bindung der löslichen MHC-Komplexe *ex vivo* durchflusszytometrisch quantifizierbar und isolierbar. Durch zusätzliche Multimerisierung

dieser Komplexe zu beispielsweise Pentameren wird ihre Avidität erhöht. Die in dieser Arbeit verwendeten MHC-I-Peptid-Pentamere H-2K<sup>b</sup>/OVA<sub>257-264</sub>, H-2K<sup>b</sup>/gB und das MVA-spezifische Pentamer H-2K<sup>b</sup>/TSYKFESV waren direkt an das Fluorochrom Phycoerythrin (PE) gekoppelt. Zur Färbung endogener, Antigen-spezifischer CD8 T-Zellpopulationen mittels Pentameren wurde wie unter 4.2.2.7 beschrieben vorgegangen.



**Abbildung. 4.6:** a) **MHC-Peptid-Fluorochrom-Komplex.** Oben sichtbar ist das Peptid (rot), gebunden an MHC (blau). In pink ist im unteren Bereich das Fluorochrom zu sehen. b) **Pentamer.** Hier sind fünf dieser Komplexe zu einem Multimer vereint. Zusammengehalten werden die Komplexe durch eine sogenannte „coiled-coil“-Domäne (grün). Quelle: ProImmune.

#### 4.2.2.10 Durchflusszytometrie (FACS Analyse)

Mit einem FACS-Gerät (*fluorescence activated cell sorter*, FACS) können die relative Größe, Granularität oder interne Komplexität und die relative Fluoreszenzintensität einer Zelle gemessen werden. Zellen werden dazu in einem Flüssigkeitsstrom durch einen fokussierten Laserstrahl geleitet, wobei beim einzelnen Passieren einer Zelle Licht gestreut wird. Das Vorwärtstreulicht (*forward angle light scatter*, FSC) ist das Maß für die Zellgröße und das Seitwärtstreulicht (*side scatter*, SSC) das Maß für die Granularität einer Zelle. Granulozyten und Makrophagen enthalten mehr Granula als Lymphozyten und weisen daher ein höheres SSC-Signal auf. Tote Zellen haben normalerweise mehr Granula als lebende Lymphozyten, sind aber deutlich kleiner. Die Fluorochrome, mit denen die Zellen gegebenenfalls markiert wurden (Methode 4.2.2.7 bis 4.2.2.9), absorbieren Licht einer spezifischen Wellenlänge und

emittieren Licht einer höheren Wellenlänge. Das emittierte Licht wird durch sogenannte *Photomultiplier* in elektronische Signale konvertiert und gibt somit Auskunft über die Anzahl fluoreszierender Zellen sowie deren Fluoreszenzintensität. Bei der Analyse der aufgenommenen Zellen kann die interessierende Zellpopulation durch Eingrenzen der entsprechenden Region genau betrachtet werden. Gängige Darstellungsweisen sind das Histogramm, bei dem nur eine Streugröße oder Fluoreszenz dargestellt wird oder das Punktwolkendiagramm (*dot plot*), bei dem zwei Streugrößen bzw. Fluoreszenzen gegeneinander dargestellt werden.

Die Messungen erfolgten mit einem FACSCalibur<sup>TM</sup>-Durchflusszytometer (Becton, Dickinson & Co., Franklin Lakes, NJ, USA) mit zwei Lasern, die Licht unterschiedlicher Wellenlänge emittieren (488 und 633 nm). Die Datenaufnahme erfolgte mit CellQuest Software, Version 3.4 (Becton, Dickinson & Co., Franklin Lakes, NJ, USA) und die Datenanalyse mit FlowJo Software, Version 6.3.2 (Tree Star, Ashland, OR, USA).

### 4.2.2.11 Adoptiver Zelltransfer

Diese Methode ermöglicht es, das Verhalten antigenspezifischer T-Zellen direkt *in vivo* zu verfolgen. Eine Population von T-Zellen, die spezifisch für ein antigenes Peptid ist, ist in der Regel zu klein (< eine pro 100.000 Zellen), um in einem nicht immunisierten Tier detektiert werden zu können. Zum Teil kann eine solche Detektion mit Hilfe von Pentameren durchgeführt werden, die aber nicht gegen jede T-Zell-Population zur Verfügung stehen. Auch in immunisierten Tieren sind die Frequenzen gering (ca. eine pro 10.000 Zellen) (Tse et al., 1980). T Lymphozyten in transgenen Tieren reagieren jedoch nicht auf Stimulation mit dem antigenen Peptid, für das sie spezifisch sind, da wahrscheinlich zu viele T-Zellen mit der gleichen Spezifität sich gegenseitig blockieren (Kearney et al., 1994).

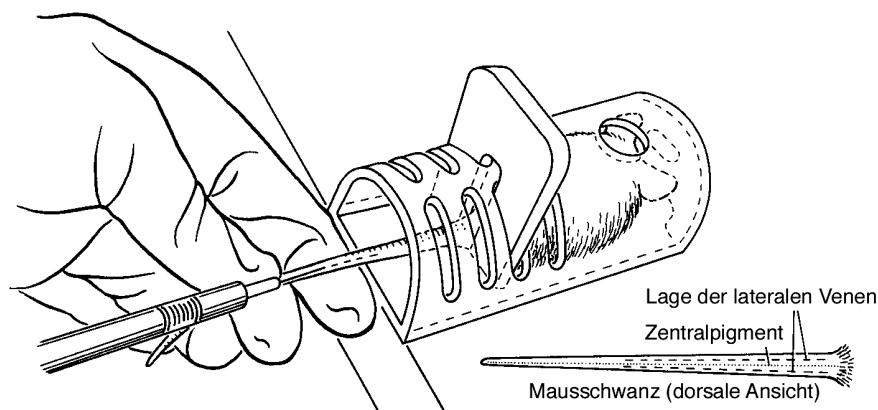
Durch Transfer von T-Zellen in syngene Empfängertiere kann dieses Problem umgangen werden. Hierdurch entsteht im Rezipienten eine Peptid/MHC-spezifische T-Zell-Population, die groß genug ist, um z.B. mittels Durchflusszytometrie detektiert werden zu können, aber klein genug, um normales Verhalten zu zeigen, wenn sie *in vivo* auf das Antigen trifft (Pape et al., 1997).

Hierzu wurden Einzelzellsuspensionen aus Milz und Lymphknoten aus OT-I- oder OT-II-Mäusen hergestellt. Die Erythrozyten in der Milzzellsuspension wurden mittels ACK-Puffer lysiert. Anschließend wurden die OT-I CD8-T-Zellen oder OT-II CD4-T-Zellen mittels CD8- oder CD4-T-Zell-Isolierungskit (MACS, Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach) durch negative Selektion isoliert. Um den prozentualen Anteil der transgenen T-Zellen zu

bestimmen, wurde eine FACS-Analyse durchgeführt. Es wurden jeweils  $5 \times 10^5$  bis  $10 \times 10^6$  OT-I- oder OT-II-Zellen pro Maus intravenös transferiert. Direkt vor der Injektion wurden die Zellen durch ein Nylonnetz (Reichelt Chemie Technik, Porengröße  $41 \mu\text{m}$ ) filtriert, um eine Verklumpung zu vermeiden. Es wurden möglichst Zellen in syngene, gleichgeschlechtliche Mäuse transferiert. Es war aber auch möglich, syngene Spenderzellen von weiblichen Mäusen in männliche Rezipienten zu transferieren. Für den Fall, dass Mäuse anschließend immunisiert werden sollten, wurde mindestens bis zum Folgetag (maximal eine Woche) gewartet, so konnten T-Zellen vorerst in ihre natürliche Umgebung migrieren.

#### 4.2.2.12 Intravenöse Injektion in Mäuse

Zur i.v. Injektion von Zellen oder i.v. Immunisierung wurden die Mäuse unter einer Infrarotlampe erwärmt, um eine Vasodilatation zu erreichen. Dies erleichtert das Erkennen der lateralen Venen auf dem Mausschwanz sowie das Injizieren. In diese Venen wurden die zu transferierenden Zellen oder das immunogene Agens mittels einer Injektionsspritze verabreicht. Um ein längeres Nachbluten durch die herbeigeführte Vasodilatation zu verhindern, wurde die Injektionsstelle kurz abgedrückt, bis die Blutgerinnung eingetreten war.



**Abbildung 4.7: Intravenöse Injektion bei der Maus** (Quelle. „Current Protocols in Immunology“, 2003, Supplement 14, John Wiley & Sons Inc., verändert)

### 4.2.2.13 Immunisierungen von Mäusen

Mittels verschiedener Immunisierungsmethoden wurden unterschiedliche Aufnahmewege diverser antigenen Agentien durch DC berücksichtigt. Ovalbumin-Protein und -Peptid werden z.B. von DC durch Makropinozytose aufgenommen (Sallusto et al., 1995). Andere Arten der Antigenaufnahme, wie die rezeptorvermittelte Endozytose, wurden z.B. durch die Verwendung von Immunkomplexen berücksichtigt (Sallusto et al., 1995; Sallusto and Lanzavecchia, 1994). Ebenso wurde mit Ovalbumin immunisiert, welches zuvor an *Polystyrenebeads* adsorbiert wurde. Solche Komplexe werden vorwiegend von DC phagozytiert (Kovacsovics-Bankowski et al., 1993; Shen et al., 1997). Die Verwendung von HSV-OVA oder MVA-OVA diente der direkten Infektion von Zellen und der damit einhergehenden endogenen Expression von Ovalbumin.

#### 4.2.2.13.1 Immunisierung mit Peptid oder Protein und Lipopolysaccharid

Lipopolysaccharid (LPS) ist ein Bestandteil Gram-negativer Bakterien und besteht aus einem extrazellulären Zuckeranteil und zur Verankerung in der Bakterienmembran aus einem Lipidanteil. Bei Vermehrung oder Tod Gram-negativer Bakterien wird LPS freigesetzt (Freudenberg et al., 1991). Hierdurch werden Granulozyten, Endothelzellen, Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen stimuliert, welche die typischen Endotoxineffekte bis hin zum septischen Schock induzieren. In dieser Arbeit wurde LPS, (Sigma, St. Louis, MO, USA) als inflammatorisches Agens zusammen mit Peptid oder Protein intravenös verabreicht, nachdem am Vortag der adoptive Transfer TCR-transgener T-Zellen erfolgte. Hierzu wurde das LPS für 5 sec in ein Ultraschall-Wasserbad gestellt, um Aggregate zu lösen. Pro Maus wurden 10 µg LPS und 10 µg Peptid bzw. 100 µg Protein (gelöst in jeweils 200 µl PBS) gemischt und i.v. injiziert.

#### 4.2.2.13.2 Immunisierung mit rekombinanten Viren (HSV-OVA oder MVA-OVA)

Die zur Immunisierung verwendeten Viren HSV-OVA bzw. MVA-OVA wurden auf Eis aufgetaut und mit PBS bis zur gewünschten Konzentration verdünnt. Anschließend wurde die Suspension gut gemischt, für 5 sec in ein Ultraschall-Wasserbad gestellt und bis zur Injektion auf Eis gelagert. Zur intravenösen Immunisierung wurden jeweils 200 µl in die Schwanzvene



injiziert. Untersucht wurde im Rahmen dieser Arbeit die spezifische Expansion endogener T-Zellen.

#### **4.2.2.13.3 Immunisierung mit Immunkomplexen**

Immunkomplexe, bestehend aus löslichem Ovalbumin (OVA) und rekombinantem OVA-spezifischen Immunglobulin G (rIgG $\alpha$ OVA) wurden hergestellt, indem sie in einem Verhältnis 1:25 für 30 min bei 37°C in PBS inkubiert wurden. Pro Maus wurde intravenös eine Menge von Immunkomplexen appliziert, die 1  $\mu$ g OVA, gelöst in einem Volumen von 200  $\mu$ l PBS, enthielt. Als Kontrolle wurde OVA verwendet, das in einem Verhältnis 1:25 mit unspezifischem rIgG inkubiert wurde. Auch hier erfolgte jeweils am Vortag der Transfer von TCR-transgenen T-Zellen.

#### **4.2.2.13.4 Immunisierung mit OVA-Partikeln**

In ein 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden 500  $\mu$ l Polystyrene-Mikropartikel (Polystyrene Microspheres, 2,0 microns, 2,56 % Solids-Latex von Polysciences, Warrington, PA, USA) gegeben. Mit 0,1 M Boratpuffer, pH 8,5, wurde das Gefäß gefüllt und anschließend gevortext. Es folgte eine Zentrifugation in der Tischzentrifuge für 5 min bei 12.000 Upm. Der folgende Schritt wurde dreimal hintereinander durchgeführt: Nach Absaugen des Überstandes wurde das Gefäß mit Boratpuffer gefüllt, das Pellet mit dem Vortex resuspendiert und erneut für 5 min zentrifugiert.

Nun folgte die Zugabe des Proteins (hier OVA bzw. DQ-OVA), dazu wurde zunächst der Überstand abgesaugt, das Pellet in 1 ml Boratpuffer resuspendiert und schließlich 500  $\mu$ g Protein beigemischt. Die Absorption des Proteins an die Polystyrene-Mikropartikel erfolgte über Nacht bei RT auf dem Schüttler mit sanftem „end to end“ Schwenken. Am nächsten Tag wurde die Suspension für 10 min bei 12.000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde für die photometrische Proteinbestimmung verwendet. Die Differenz zwischen der eingesetzten und der gemessenen Proteinmenge aus dem Überstand ergab die Menge Protein, welche an die Polystyrene-Mikropartikel gebunden hat. Der folgende Schritt wurde drei mal wiederholt: Das Pellet wurde in 1 ml Boratpuffer resuspendiert, welchem 10 mg/ml BSA hinzugefügt wurden; 30 min lang wurde die Suspension dann bei RT wie oben beschrieben geschwenkt und nach 5-minütiger Zentrifugation der Überstand entfernt.

Das Pellet wurde vor der Injektion einmal mit PBS gewaschen, in 1 ml PBS resuspendiert, durch feines Siebgewebe gefiltert und zur intravenösen Injektion für fünf Mäuse verwendet. Der Transfer TCR-transgener T-Zellen wurde am Vortag vorgenommen.

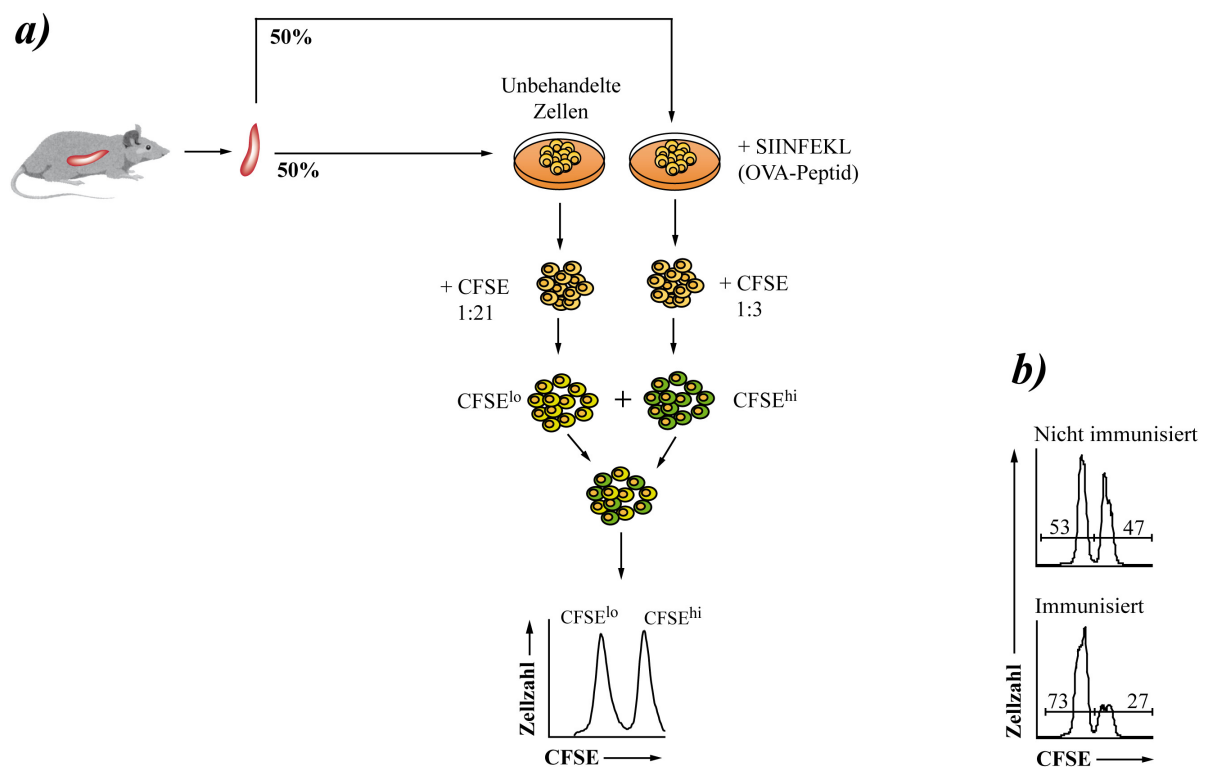
### **4.2.2.14 Markierung von Zellen mit Carboxyfluorescein-Diacetate-Succinimidylester (CFSE)**

Zur CFSE-Markierung von Zellen wurden Einzelzellsuspensionen aus soliden Organen hergestellt und eventuell vorhandene Erythrozyten mittels ACK-Puffer entfernt. Die Zellen wurden zweimal in PBS gewaschen, um Reste von FBS aus der Lösung zu entfernen, da größere Mengen die Färbung mit CFSE inhibieren würde. Die Resuspension erfolgte in 0,3 % FBS in PBS wenn die markierten Zellen später zusätzlich mit drei spezifischen fluorochrommarkierten Antikörpern am FACSCalibur analysiert werden sollten. Auf diese Weise wurde die gegenseitige Kompensation der vier Fluorochrome während der Datenaufnahme ermöglicht. War eine Kompensation nicht notwendig, wurde für eine höhere CFSE-Intensität PBS für die CFSE-Markierung verwendet. Die Zellen wurden mit 5  $\mu\text{M}$  CFSE pro  $1-50 \times 10^6$  Zellen 10 Minuten bei 37°C abgedunkelt inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von einem Volumen FBS gestoppt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und zur späteren Injektion in PBS suspendiert.

### **4.2.2.15 *In vivo* Zytotoxizitätstest**

Dieser Test erlaubt die Messung der zytotoxischen Effektorfunktion von CD8-T-Zellen *in vivo* (Coles et al., 2002). Zur Durchführung dieses Tests wurden Einzelzellsuspensionen von Milz und Lymphknoten präpariert und die Erythrozyten lysiert. Die Zellen wurden in Zellinkubationsmedium aufgenommen und in zwei Hälften aufgeteilt (Abbildung 4.9). Die eine Hälfte wurde mit OVA-Peptid beladen, indem dem Zellkulturmedium OVA<sub>257-264</sub> (20  $\mu\text{g/ml}$ ) zugefügt wurde. Die Zellen wurden bei 37°C für eine Stunde inkubiert und anschließend mit einer hohen Konzentration Carboxyfluorescein-Diacetate-Succinimidylester (CFSE, 1,7  $\mu\text{M}$ ) angefärbt (CFSE<sup>hi</sup> Zellen). Die andere Hälfte erhielt kein Peptid und wurde mit einer niedrigen Konzentration CFSE (0,2  $\mu\text{M}$ ) angefärbt (CFSE<sup>lo</sup> Zellen). Die CFSE-Färbung wurde wie unter 4.2.2.14 beschrieben durchgeführt. Vor der Injektion wurden die Zellen beider Populationen im Verhältnis 1:1 vermischt, und jeder Maus  $20 \times 10^6$  Zellen intravenös injiziert (Abbildung 4.9). Die Zellen wurden in syngene Mäuse transferiert, die

einige Tage bis Wochen (je nach Experiment) zuvor immunisiert worden waren. Mit diesem Test konnte die Effizienz der zytotoxischen OVA-spezifischen T-Zellen gemessen werden. Während die Zellen, die mit OVA beladen sind (im CFSE-Histogramm rechts zu sehen) das Ziel einer Lysereaktion sind, sollten transferierte Zellen, die kein OVA enthalten (im CFSE-Histogramm links zu sehen) nicht zerstört werden. Sie dienen einerseits als Kontrolle und lassen des Weiteren eine genaue Kalkulation über das Ausmaß der spezifischen Lyse zu. Die Mäuse wurden für diese Analyse nach 5-15 Stunden getötet, um ihre Milzen zu isolieren. Die Milzzellen wurden mittels Durchflusszytometrie ausgewertet. Beide Populationen der transferierten Zellen wurden durch ihre unterschiedliche CFSE-Fluoreszenzintensität detektiert (Abbildung 4.8).



**Abbildung 4.8: In vivo Zytotoxizitätstest.** a) Schematische Darstellung der Vorbereitung eines *in vivo* Zytotoxizitätstests. Exakt die Hälfte einer Milzzellsuspension wird mit OVA-Peptid beladen, während die andere Hälfte unbehandelt bleibt. Diese beiden Milzzell-Hälften werden mit jeweils unterschiedlicher CFSE-Menge gefärbt, wie im Histogramm sichtbar wird. b) Beispiel einer Analyse nach erfolgtem *in vivo* Zytotoxizitätstest. Zu sehen ist die spezifische Lyse SIINFEKL-beladener Milzzellen (rechter Peak) in immunisierten Mäusen.

Anhand des Verhältnisses CFSE<sup>lo</sup> zu CFSE<sup>hi</sup>-Zellen wurde die spezifische Lyse mit der folgenden Formel berechnet:

Verhältnis beider Populationen zueinander:

$$r = (\text{Prozentsatz CFSE}^{\text{lo}} / \text{Prozentsatz CFSE}^{\text{hi}})$$

Prozentsatz der spezifischen Lyse (PSL):

$$\text{PSL} = [1 - (r \text{ von nicht immunisierter Maus} / r \text{ von immunisierter Maus}) \times 100]$$

### 4.2.2.16 *In vivo* Kreuztoleranztest

Mit diesem Test wurde untersucht, ob Kreuzpräsentation für die periphere Toleranzinduktion eine Rolle spielt und die Toleranzinduktion in CD11c-Rac1(N17)-Mäusen, die eine verminderte Kreuzpräsentation aufweisen, schlechter funktioniert. In diesem Fall könnten selbstreaktive T-Zellen aus CD11c-Rac1(N17)-Mäusen eventuell anhand ihrer Proliferation messbar sein.

Um solch eine Proliferation zu untersuchen, wurden aus CD11c-Rac1(N17)- und C57BL/6-Mäusen T-Zellen mit MACS (*Pan T Cell Isolation Kit*) isoliert und mit CFSE markiert.  $10 \times 10^6$  T-Zellen wurden jeweils i.v. in C57BL/6 in Thy1.1 Hintergrund injiziert. So konnte sichergestellt werden, dass transferierte CFSE-markierte Thy1.2<sup>+</sup> T-Zellen in der FACS-Analyse über den Thy1.2 Marker identifiziert werden konnten. Eine Woche nach dem Zelltransfer wurden die Milzen entnommen und durchflusszytometrisch analysiert. Dabei diente die CFSE-Verdünnung als Funktion der Proliferation.

### 4.2.2.17 *In vivo* Proliferationstest

$10 \times 10^6$  isolierte (CD8a<sup>+</sup> *T Cell Isolation Kit*) und CFSE-markierte OT-I Zellen aus B6SJL-Mäusen (C57BL/6 in Ly5.1) wurden i.v. in CD11c-Rac1(N17) x Rip-mOVA (Rac/Rip) - Mäuse und Rip-mOVA-Mäuse (Ly5.2<sup>+</sup>) injiziert. Nach ca. 65 Stunden wurden die drainierenden renalen und pankreatischen (1 und 2) Lymphknoten entnommen. Nicht-drainierende inguinale Lymphknoten wurden für die Darstellung eines Kontrollwertes ebenso entnommen. Aus den Organen wurden Einzelzellsuspensionen hergestellt, die Zellzahl pro Organ wurde bestimmt und zur Detektion der exogenen OT-I Zellen in der FACS-Analyse wurden die Zellen mit dem Antikörper CD45.1 (= Ly5.1) gefärbt. Anschließend konnte die

Proliferation als Funktion der CFSE-Verdünnung analysiert werden. Ferner wurde der absolute Anteil der OT-I-Zellen bestimmt, der sich geteilt bzw. nicht geteilt hat.

#### **4.2.2.18 Herstellung von Knochenmarkchimären**

Zur Herstellung von Knochenmarkchimären wurden die Knochenmarkempfängertiere mit 950 rad einer Cäsium-137-Quelle (Model G.C. 40; Type B(4); Atomic Energy of Canada Limited, Ontario, Kanada) bestrahlt, um alle teilungsfähigen Zellen im Knochenmark der Tiere abzutöten. Sechs Stunden nach der Bestrahlung wurden die Knochenmarkzellen der Tiere rekonstituiert indem ins Knochenmark einwandernde Donor-Knochenmarkzellen adoptiv transferiert wurden. Die Donorzellen wurden aus Femur und Tibia beider Beine der Donormäuse gewonnen, die mit einer Schere aus dem Tier herausgelöst wurden. Die Knochen wurden in einem Mörser für fünf Minuten in 80 % (v/v) Ethanol desinfiziert und mit PBS sorgfältig gespült. Die Knochen wurden nun sehr sachte mit einem Mörser in etwas RPMI-Medium zerdrückt, bis sich die Knochenmarkszellen herauslösten. Ein starkes Reiben auf den Knochen wurde vermieden, um nicht zu viele Knochenbestandteile in die Lösung zu überführen. Die Knochen wurden mit Medium gespült und es folgte eine Filterung durch einen *Cell strainer* sowie eine Zentrifugation der Zellen für 5 min bei 1.200 Upm. Jeweils  $4 \times 10^6$  Zellen wurden einmal in PBS gewaschen und gefiltert bevor sie intravenös in die bestrahlten Empfängertiere injiziert wurden.

### **4.3 Statistik**

Mittelwerte, Standardabweichungen und p-Werte (Student'scher *t*-Test) wurden mit dem Programm Microsoft® Excel 2004 berechnet. Dabei bedeuten: \* (signifikant):  $p \leq 0,05$ ; \*\* (hoch signifikant):  $p \leq 0,01$  und \*\*\* (extrem signifikant):  $p \leq 0,001$ .

## 5 Ergebnisse

Um die von Kerksiek et al. (Kerksiek et al., 2005) generierte CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> Mauslinie für *in vivo* Kreuzpräsentationsstudien zu verwenden, wurde zu Beginn der Doktorarbeit die Eignung des neuen Mausmodells für solche Studien experimentell ausgearbeitet. Die Auswirkungen der dominant-negativen Form der Rho GTPase Rac1 unter der Kontrolle des CD11c Promotors in diesen transgenen Mäusen wurde zu einem Teil bereits von Kerksiek et al. beschrieben. Es wurde gezeigt, dass Reifung und Migration in CD11c<sup>+</sup> DC aus CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> Mäusen im Vergleich zu nichttransgenen Mäusen (engl.: *nontransgenic littermates*, NTL) nicht beeinträchtigt war. Die Gesamtzellzahl der CD11c<sup>+</sup> DC war zwar nicht verändert, jedoch zeichnet sich der Phänotyp der CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> Maus durch ein verändertes Verhältnis von CD8<sup>+</sup> und CD8<sup>-</sup> DC aus. Während in NTL etwa 32 % aller CD11c<sup>+</sup> DC CD8<sup>+</sup> waren, wiesen CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> Mäuse nur etwa 23 % CD8<sup>+</sup> DC auf. Zellassoziierte Antigene wurden durch transgene DC schlechter phagozytiert, außerdem konnten sie Ag schlechter an zytotoxische T-Lymphozyten kreuzpräsentieren.

Es waren im Rahmen dieser Dissertation zunächst weitergehende Analysen durchzuführen, was den Phänotyp dieser transgenen Mauslinie betraf (Abschnitt 5.1). So wurden, nachdem zellassoziierte Ag bereits geprüft wurden, lösliche Proteine und Peptide verwendet. Ovalbumin (OVA) schien ein besonders geeignetes Modellantigen zu sein, da etablierte Mausmodelle existieren, welche einerseits OVA-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen liefern (OT-I Mäuse), die OVA im Kontext von MHC-Klasse I erkennen (OT-I Zellen). Andererseits existiert ein Mausmodell (Rip-mOVA), welches membrangebundenes OVA (mOVA) unter der Kontrolle des Ratten-Insulin-Promotors (engl.: *rat insulin promoters*, Rip) in den  $\beta$ -Inselzellen des Pankreas, den Nieren und im Thymus exprimiert. mOVA in Rip-mOVA Mäusen stellt damit ein optimales Modell-Gewebsantigen dar, welches für Studien über periphere Toleranz verwendet werden kann. Für Studien zur peripheren Toleranzinduktion (Abschnitt 5.2) durch Kreuzpräsentation wurde eine doppeltransgene Maus (CD11c-Rac1(N17) x Rip-mOVA; = Rac/Rip) gezüchtet, in der die Kreuzpräsentation des Modell-Gewebsantigens mOVA inhibiert war.

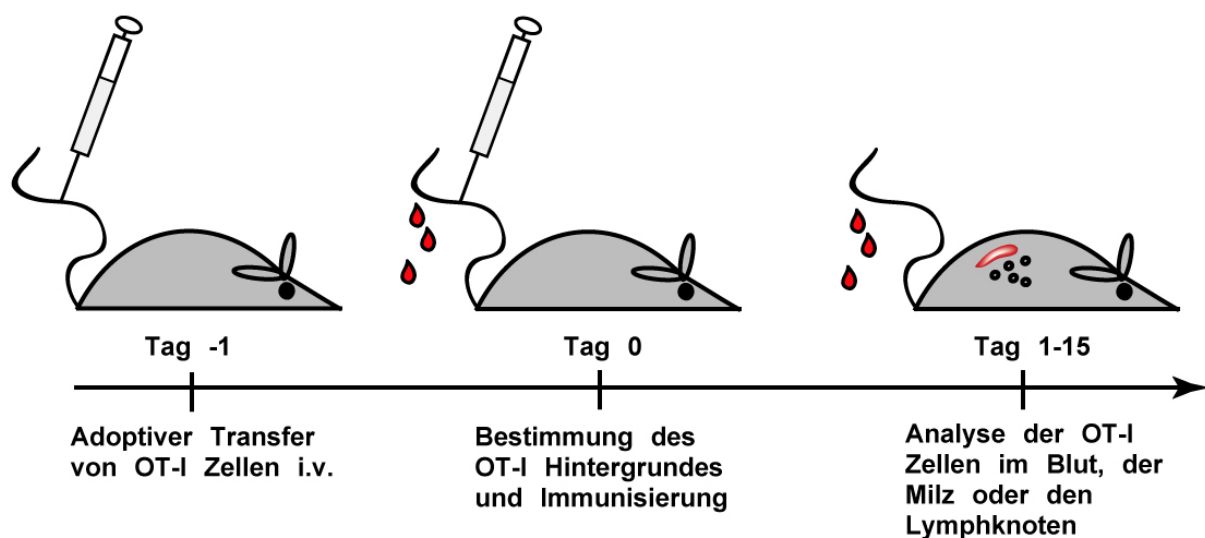
OVA ist zudem ein Protein, das bei Verabreichung ohne Adjuvans Toleranz auslöst, erst unter Zugabe von Adjuvantien wie Lipopolysaccharid (LPS) findet *cross-priming* statt. So können spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zell Reaktionen auf kreuzpräsentierte Ag hin analysiert werden, und zwar im Rahmen von Immunität und Toleranz.

Da CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> Mäuse heterozygot für die Rac1(N17) Mutante sind, wurden die Tiere vor Verwendung genotypisch charakterisiert (siehe 4.2.1.3 und 4.2.1.4).

## 5.1 Charakterisierung der CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> Mauslinie

Für die unter 5.1. aufgeführten Experimente galt im Wesentlichen der in Abb. 5.2 dargestellte experimentelle Ablauf. Zu untersuchende exogene OVA-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen (OT-I) wurden 24 Stunden vor der Immunisierung intravenös (i.v.) in die Rezipienten injiziert (Methoden 4.2.2.11 und 4.2.2.12). Die OT-I Zellen wurden mit MACS (4.2.2.2.1 und 4.2.2.5) aus Milz und Lymphknoten der OT-I Mäuse isoliert. Eine physiologische Menge von  $5 \times 10^5$  OT-I Zellen wurde in dieser Arbeit verwendet, wenn nichts anderes erwähnt ist.

In regelmäßigen Abständen erfolgte die Messung der antigenspezifischen CD8 T-Zell Expansion im peripheren Blut mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper (Methoden 4.2.2.7 und 4.2.2.10). Die durchflusszytometrische Analyse der OT-I Zellen nach Transfer geschah zunächst durch Identifizierung der Lymphozytenpopulation innerhalb der präparierten Gesamtzellen anhand der Zellgröße (FSC) und Granularität (SSC). Anschließend wurde der in dieser Population enthaltene Prozentsatz an CD8 T-Zellen mittels anti-CD8-Antikörper ( $\alpha$ CD8) bestimmt. Innerhalb der CD8 T-Zellpopulation wurden OT-I T-Zellen anhand ihres TCR durch anti- $\nu\alpha 2$  und anti- $\nu\beta 5.1/5.2$  Antikörper identifiziert. Durch den Einsatz von Antikörpern gegen Aktivierungsmarker wie  $\alpha$ CD44 und  $\alpha$ CD62L konnte darüber hinaus der Aktivierungszustand der OT-I Zellen bestimmt werden.



**Abb. 5.1:** Schematische Darstellung des experimentellen *in vivo* Ablaufs zur Analyse von CTL-Antworten auf spezifische Antigene. Um eine OVA-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zell Antwort zu analysieren, wurden zunächst OT-I Zellen, die zuvor von OT-I Mäusen (nicht abgebildet) gewonnen wurden, adoptiv in die Schwanzvene unbestrahlter Rezipienten (siehe Abbildung, **Tag -1**) transferiert. Am nächsten Tag (**Tag 0**) wurde diesen Mäusen früh morgens Schwanzvenenblut zur Bestimmung des OT-I Hintergrundes entnommen, und nachmittags wurden sie i.v. mit OVA-Peptid bzw. -Protein immunisiert. An den folgenden Tagen wurden die spezifischen T-Zell-Antworten im Schwanzvenenblut charakterisiert (**Tag 1-15**).

In Versuchen mit Virusinfektionen wurden endogene CTL-Antworten auf Ovalbumin untersucht.

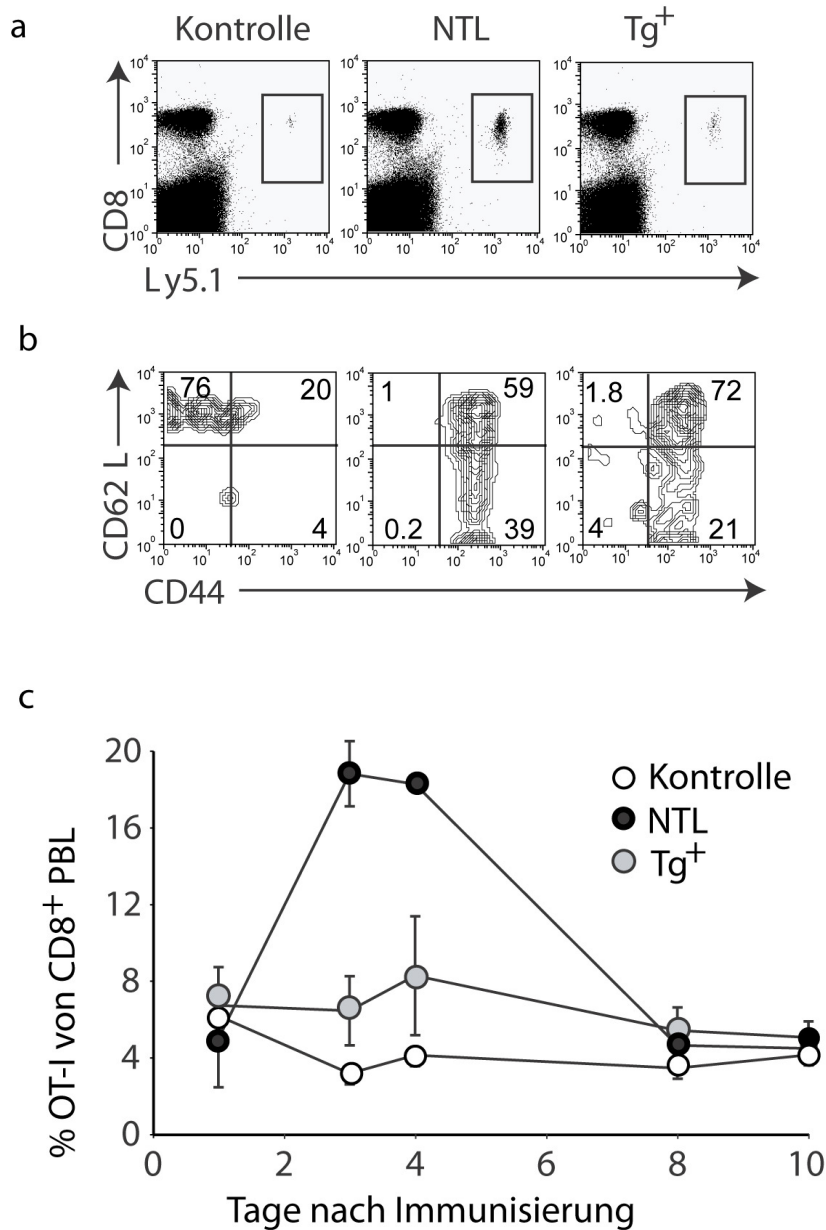
Spezifische Antworten von endogenen CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden mittels Immunisierung mit Virusantigenen ermittelt, indem zuvor mit HSV-OVA oder MVA-OVA immunisiert wurde (5.1.3). Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte hier entsprechend, nur dass endogene OVA-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen in diesem Fall mit Pentameren nachgewiesen wurden (4.2.2.9). Mit Pentameren konnte die relativ geringe Anzahl spezifischer endogener T-Zellen durch verstärkte Fluoreszenzbindung nachgewiesen werden.

### 5.1.1 Reduzierte *in vivo* Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch lösliches OVA

Das lösliche Modell-Antigen Ovalbumin wird von DC durch Makropinozytose aufgenommen, wenn es in relativ hohen Mengen vorhanden ist (Mitchell et al., 1998; Rock et al., 1990). Hauptsächlich wird es jedoch durch den Mannose-Rezeptor (MR) aufgenommen, wie an MR-defizienten Mäusen gezeigt wurde (Burgdorf et al., 2006). Die Aktivierung von OT-I Zellen mit löslichem OVA war in diesen Mäusen stark beeinträchtigt. Von Kerksiek et al. wurde gezeigt, dass die Makropinozytose von OVA-FITC in transgenen Mäusen im Vergleich zu NTL reduziert ist. Eine reduzierte Kreuzpräsentation wurde jedoch lediglich an transgenen Mäusen gezeigt, die mit zellassoziertem OVA immunisiert wurden.

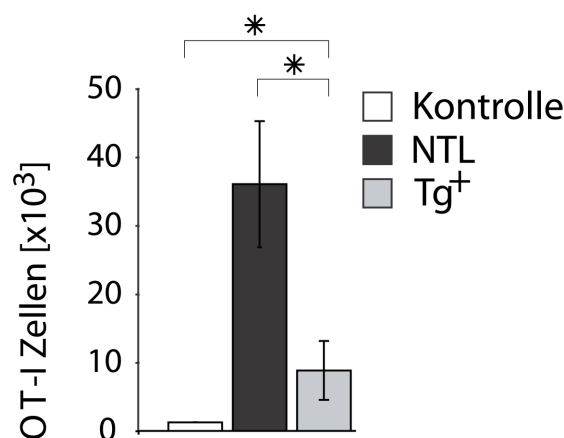
Um die Reaktionen von spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen auf die Präsentation von löslichem OVA-Protein durch MHC-Klasse I zu untersuchen, wurden CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> Mäuse sowie NTL jeweils mit 100 µg OVA-Protein und dem Adjuvans LPS immunisiert. Eine Kontrollgruppe erhielt nur LPS. Die Expansion der OT-I Zellen im peripheren Blut wurde zu verschiedenen Zeitpunkten mittels FACS-Analyse gemessen (siehe Abb. 5.2). In NTL Rezipienten expandierten OT-I Zellen ein Vielfaches mehr verglichen zu OT-I Zellen in Kontrollmäusen, die nur LPS, aber kein Ag erhielten. Während OT-I Zellen in Kontrollmäusen über den gesamten gemessenen Zeitraum hinweg 3-4 % aller CD8<sup>+</sup> peripheren Blutlymphozyten (engl.: *peripheral blood lymphocytes*, PBL) ausmachten, waren OT-I Zellen in NTL an Tag drei nach Immunisierung auf ein Expansionsmaximum von 18,8 ± 1,8 % aller CD8<sup>+</sup> PBL expandiert. An Tag acht ging die OT-I Population auf den Hintergrundwert nicht immunisierter Mäuse zurück.





**Abb. 5.2: *In vivo* OT-I Expansion und Aktivierung nach einer Immunisierung mit OVA-Protein und LPS.**  $3,5 \times 10^6$  OT-I Zellen wurden adoptiv transferiert. Immunisiert wurde mit  $100 \mu\text{g}$  OVA-Protein und  $50 \mu\text{g}$  LPS. In einem *Dotplot* (**a**) wird gezeigt, wie OT-I Zellen ( $\text{CD8}^+ \text{Ly5.1}^+$ ) visualisiert wurden. In a) sind alle Blut-Lymphozyten an Tag drei nach Immunisierung dargestellt, während die OT-I Zellen sich im gezeigten *gate* befinden. Eine Kinetik der OT-I Zell Populationen ist in **c**) zu sehen. **b**) zeigt den Aktivierungszustand der OT-I Zellen an Tag drei nach Immunisierung. Der Versuch wurde mehr als dreimal mit vergleichbaren Ergebnissen wiederholt und mit vier bis fünf Mäusen pro Gruppe durchgeführt. **Kontrolle:** Ausschließlich mit LPS behandelte NTL; **NTL:** CD11c-Rac1(N17) -transgennegative Mäuse (engl.: *nontransgenic littermates*); **Tg<sup>+</sup>:** CD11c-Rac1(N17) -transgene Mäuse.

In CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> Mäusen war die OT-I Expansion stark inhibiert, am Expansionsmaximum etwa um das Dreifache, und gegenüber der Expansion in Kontrollmäusen nur wenig (nicht signifikant mit  $p = 0,32$  nach dem Student'scher t-Test) angehoben (Abb. 5.2 c). Der Unterschied zu NTL war jedoch mit  $p = 1,5 \times 10^{-5}$  extrem signifikant. Die wenigen expandierenden OT-I Zellen in transgenen Mäusen hatten an Tag drei einen aktivierten Phänotyp (CD44<sup>hi</sup> CD62L<sup>lo</sup>), wie man in Abb. 5.2 b) sehen kann, während OT-I Zellen an Tag 0 in allen Mäusen in einem nicht aktivierten (CD44<sup>lo</sup> CD62L<sup>hi</sup>) Zustand waren (Daten nicht gezeigt). An Tag drei zeigten jedoch weniger OT-I Zellen in transgenen Mäusen ( $21,6 \pm 0,3\%$ ) einen voll aktivierten Phänotyp als in NTL ( $35,2 \pm 6,4\%$ ). Repräsentativ für den gesamten Zeitraum werden hier die Daten über den Aktivierungszustand an Tag drei gezeigt (Abb. 5.2 b). Die aus dem peripheren Blut entnommenen Daten konnten auch mit einer Analyse der Lymphknoten und Milz bestätigt werden (siehe z.B. Abb. 5.3).



**Abb. 5.3: Gesamtzahl der OT-I Zellen an Tag drei nach Immunisierung mit OVA-Protein und LPS.**

Das Balkendiagramm zeigt die totale OT-I Zellzahl in der Milz an Tag drei nach der Immunisierung mit OVA-Protein und LPS. Milzzellen wurden gezählt und OT-I Zellzahlen wurden mittels prozentualen Anteils zurückgerechnet. Verwendet wurden drei Mäuse pro Gruppe in mehr als drei Durchgängen mit ähnlichen Ergebnissen.

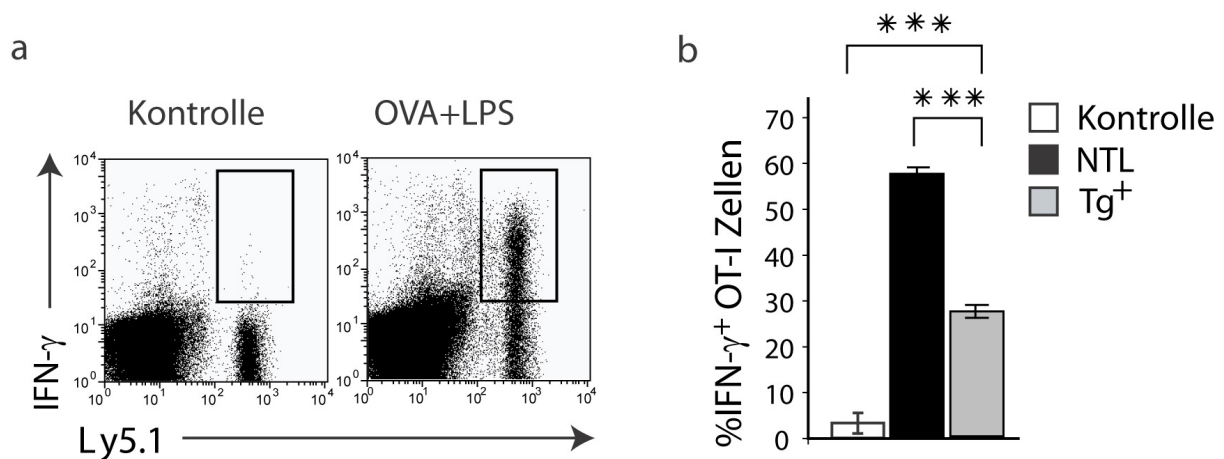
**Kontrolle:** Ausschließlich mit LPS behandelte NTL; **NTL:** CD11c-Rac1(N17) -transgennegative Mäuse (engl.: *nontransgenic littermates*); **Tg<sup>+</sup>:** CD11c-Rac1(N17) -transgene Mäuse.

\* = signifikant, siehe auch Statistikkapitel 4.3.

Neben der Angabe von prozentualen Werten sind Angaben über totale Zellzahlen sehr wichtig. Damit wird ausgeschlossen, dass ein eventuell verändertes Verhältnis von verschiedenen Lymphozyten zueinander ein verfälschtes Bild über die entsprechenden Kapazitäten der spezifischen OT-I Zellen wiedergibt. Abb. 5.3 zeigt die Analyse der Gesamtzahl von OT-I Zellen in der Milz am Expansionsmaximum (Tag 3) und ist repräsentativ für den gesamten Zeitraum der Analyse. Die totale Zellzahl in transgenen Mäusen war mit  $8,2 \times 10^3 \pm 4,2 \times 10^3$  gegenüber NTL mit  $35,4 \times 10^3 \pm 9,9 \times 10^3$  signifikant ( $p = 0,012$ ) um das 3,5-fache reduziert und gegenüber dem gemessenen Hintergrund

(Kontrolle:  $1,18 \times 10^3 \pm 0,03 \times 10^3$ ) mit  $p = 0,021$  signifikant angehoben. Die Analyse der totalen Zellzahlen geht damit konform mit den prozentualen Angaben.

Da eine Auswertung von Expansion und Aktivierungsmarkern nicht ausreichend ist, um auf eine funktionelle Induktion von Effektor-CD8 T-Zellen zu schließen, wurde weiterhin die intrazelluläre Produktion des Effektorzytokins IFN- $\gamma$  in aktivierten OT-I Zellen untersucht. Die Rezipienten wurden entsprechend 5.1.1 nach OT-I Transfer i.v. mit LPS und Ovalbumin immunisiert. An Tag drei wurde die Milz der Mäuse präpariert und die Milzzellen wurden für 5 h in vitro mit dem OVA<sub>257-264</sub> Peptid SIINFEKL restimuliert (siehe 4.2.2.8). Anschließend wurde der Prozentsatz IFN- $\gamma$  produzierender OT-I Zellen mittels OT-I spezifischer Antikörper und  $\alpha$  IFN- $\gamma$  durchflusszytometrisch bestimmt.

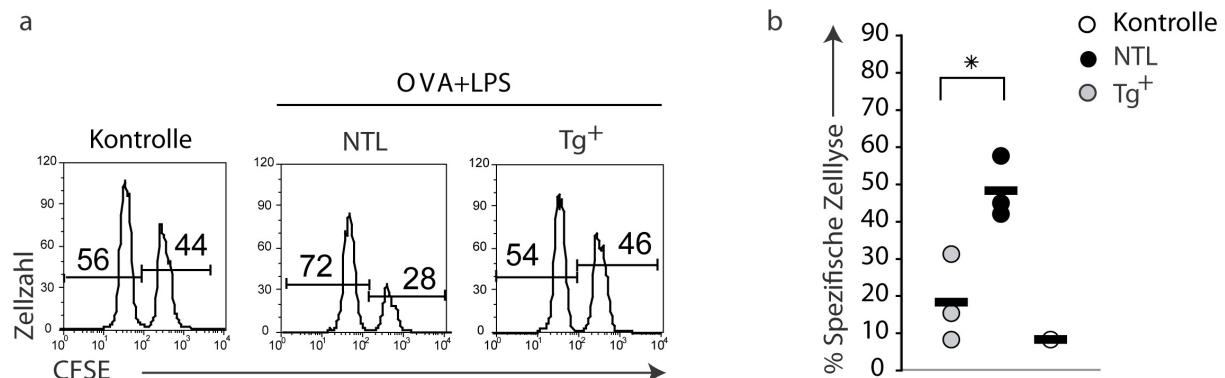


**Abb. 5.4: Intrazelluläre IFN- $\gamma$  Produktion in OT-I Zellen an Tag drei nach Immunisierung mit OVA-Protein und LPS.**  $5 \times 10^5$  OT-I Zellen wurden adoptiv transferiert. Immunisiert wurde mit 100  $\mu$ g OVA-Protein und 10  $\mu$ g LPS. In **a**) sind im angezeigten *gate* alle OT-I Zellen (Ly5.1<sup>+</sup>) der Milz-Lymphozyten Population dargestellt, die positiv sind für intrazelluläres IFN- $\gamma$ . In **b**) sind Werte von mindestens drei Mäusen pro Gruppe zusammengefasst. In zwei weiteren Experimenten wurden vergleichbare Ergebnisse erzielt. **Kontrolle:** Ausschließlich mit LPS behandelte NTL; **NTL:** CD11c-Rac1(N17)-transgennegative Mäuse (engl.: *nontransgenic littermates*); **Tg<sup>+</sup>:** CD11c-Rac1(N17)-transgene Mäuse. \*\*\* = extrem signifikant, siehe auch Statistikkapitel 4.3.

In Abb. 5.4 ist die IFN- $\gamma$  Produktion an Tag drei nach der Immunisierung dargestellt.  $27,1 \pm 1,4$  % der OT-I Zellen in transgenen Mäusen haben gegenüber  $56,7 \pm 0,9$  % in nichttransgenen Mäusen IFN- $\gamma$  produziert (Abb. 5.4 b). Die IFN- $\gamma$  Produktion war damit in transgenen Mäusen extrem signifikant um ca. ein Drittel reduziert. Auch gegenüber dem

Hintergrund (nicht immunisierte Mäuse = Kontrolle) war die IFN- $\gamma$  Produktion in transgenen Mäusen mit  $p = 2,3 \times 10^{-5}$  bereits extrem signifikant angehoben.

Im nächsten Schritt wurde die funktionelle Zytotoxizität der mit OVA-Protein aktivierten OT-I Zellen mit einem *in vivo* Zytotoxizitätstest (engl.: *in vivo* killer assay) zu verschiedenen Zeitpunkten nach Immunisierung untersucht. Nach einem OT-I Transfer wurden transgene Mäuse und NTL mit OVA-Protein und LPS immunisiert. Der in Abb. 5.5 dargestellte *in vivo* Zytotoxizitätstests, der an Tag 3 nach Immunisierung angesetzt wurde, ist ebenso repräsentativ für den Zeitpunkt Tag 10 nach Immunisierung (Daten nicht gezeigt). Die spezifische Lyse in NTL-Rezipienten betrug 7 h nach Zelltransfer  $48,3 \pm 8,3$  %, während OT-I Zellen in CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> Mäusen mit  $18,3 \pm 11,7$  % spezifischer Lyse zwei- bis dreifach weniger effizient waren. Der Hintergrund betrug 8,3 % spezifische Lyse, wie mit nicht immunisierten Kontrollmäusen gezeigt wurde. Die spezifische Lyse war damit in transgenen Mäusen signifikant ( $p = 0,023$ ) reduziert gegenüber der in immunisierten C57BL/6 Mäusen, wobei sie gegenüber der spezifischen Lyse in nicht immunisierten Mäusen nur leicht angehoben war (nicht signifikant mit  $p = 0,33$ ).



**Abbildung. 5.5: *In vivo* Zytotoxizitätstest an Tag drei nach Immunisierung mit OVA-Protein und LPS.**  $5 \times 10^5$  OT-I Zellen wurden adoptiv transferiert. Immunisiert wurde mit  $100 \mu\text{g}$  OVA-Protein und  $10 \mu\text{g}$  LPS. Die spezifische OT-I Zytotoxizität wurde an, mit SIINFEKL beladenen, CFSE-markierten Milzzellen gemessen, die durch jene aktivierte OT-I Zellen deletiert werden. Messbar wurde die zytotoxische Tätigkeit dadurch, dass mit Ag beladene (rechte Kurve) und nichtbeladene (linke Kurve) Milzzellen vor Injektion in das Versuchstier mit unterschiedlicher CFSE-Intensität markiert wurden (a). Als Kontrolle für den Zytotoxizitätstest dienten NTL Rezipienten, denen lediglich LPS injiziert wurde (gezeigt in a) und b)) sowie unbehandelte NTL (nicht gezeigt). Die spezifische Lyse wurde berechnet und in b) für jeweils drei Mäuse pro Gruppe dargestellt. In zwei weiteren Versuchen wurden vergleichbare Ergebnisse ermittelt. **Kontrolle:** Ausschließlich mit LPS behandelte NTL; **NTL:** CD11c-Rac1(N17) -transgennegative Mäuse (engl.: *nontransgenic littermates*); **Tg<sup>+</sup>:** CD11c-Rac1(N17) -transgene Mäuse. \* = signifikant, siehe auch Statistikkapitel 4.3.

Zusammenfassend bestätigen die Ergebnisse aus 5.1.1, dass die Kreuzpräsentation von antigenen Epitopen, die von löslichen OVA-Proteinen stammen, in CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> Mäusen stark inhibiert ist.

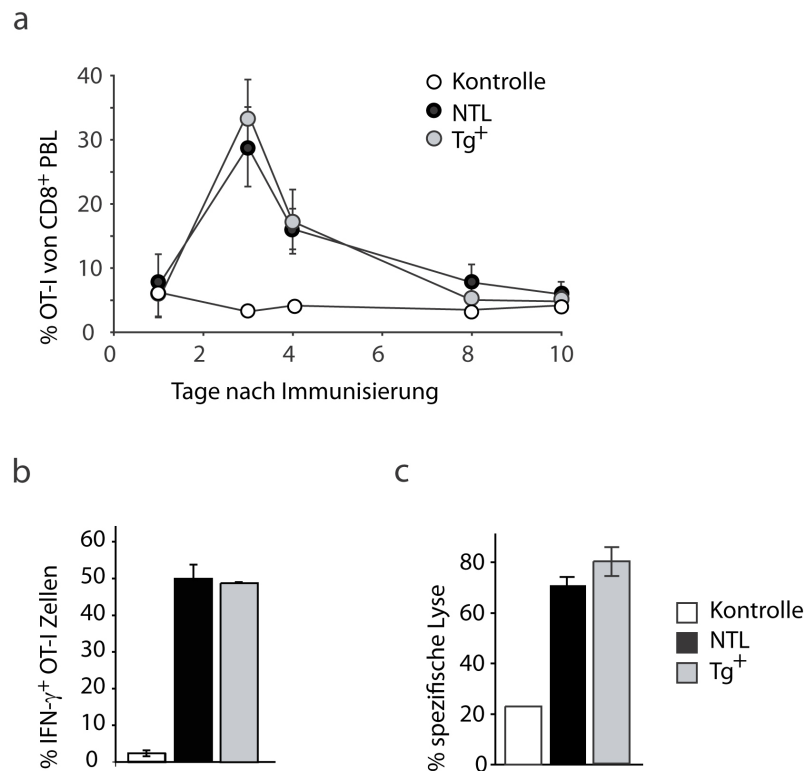
### 5.1.2 Normale *in vivo* Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch lösliches OVA<sub>257-264</sub>

Vor zwei Jahren haben Benvenuti et al. gezeigt, dass DC von Mäusen mit einem Doppel-Knockout von Rac1 und Rac2 einen generellen Defekt in der Aktivierung von T-Zellen haben (Benvenuti et al., 2004). Dieser Defekt basiert auf einer verschlechterten Interaktion mit CD4<sup>+</sup> T-Zellen, somit wurden vorwiegend CD4<sup>+</sup> T-Zell Antworten untersucht. Effekte, ausgelöst durch einen einfachen Knockout von Rac1, wurden nicht beschrieben. Es war daher nicht auszuschließen, dass DC von CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> Mäusen einen generellen Defekt in der Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen und nicht nur einen Defekt in der Kreuzpräsentation aufweisen. Um das auszuschließen, wurden CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> Mäuse mit dem MHC-Klasse I restringierten OVA<sub>257-264</sub> Peptid SIINFEKL und LPS immunisiert. Dies erlaubt eine direkte Peptidbeladung von MHC-Klasse I Molekülen und eine direkte Präsentation an CTL.

Um die Reaktionen von spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen auf die Präsentation von löslichem Peptid durch MHC-Klasse I zu untersuchen, wurden CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> Mäuse sowie NTL mit 10 µg OVA<sub>257-264</sub> (SIINFEKL) und dem Adjuvans LPS immunisiert. Eine Kontrollgruppe erhielt nur LPS. Die Expansion der OT-I Zellen im peripheren Blut wurde zu verschiedenen Zeitpunkten mittels FACS-Analyse gemessen (siehe Abb. 5.6).

In NTL Rezipienten expandierten OT-I Zellen ein Vielfaches mehr verglichen zu denen in Kontrollmäusen, die nur LPS, aber kein Ag erhielten. Während OT-I Zellen in Kontrollmäusen über den gesamten gemessenen Zeitraum hinweg 3 bis 4 % aller CD8<sup>+</sup> peripheren Blutlymphozyten ausmachten, waren OT-I Zellen in NTL an Tag drei nach Immunisierung auf ein Expansionsmaximum von  $28,9 \pm 6,2$  % aller CD8<sup>+</sup> PBL expandiert. An Tag zehn ging die OT-I Population auf den Hintergrundwert nicht immunisierter Mäuse zurück. In CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> Mäusen lag die OT-I Expansion an Tag drei nach Immunisierung bei  $34,1 \pm 5,2$ . Mit  $p = 0,24$  zeigte diese OT-I Expansion verglichen mit der in nicht-transgenen Mäusen keinen signifikanten Unterschied (Abb. 5.6 a). Die expandierenden OT-I Zellen im peripheren Blut hatten über den gesamten Zeitraum in transgenen und nicht-transgenen Mäusen einen ähnlich aktivierten Phänotyp (CD44<sup>hi</sup> CD62L<sup>lo</sup>), der an Tag fünf sein Maximum erreichte. Hier waren  $19,1 \pm 6,1$  % aller OT-I Zellen in NTL voll aktiviert

und in transgenen Mäusen  $15,1 \pm 2,95$  %. Dieser Unterschied war nach dem t-Test mit  $p = 0,06$  nicht signifikant. Die gesammelten Daten konnten mit einer Milz-Analyse bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Die totale Anzahl von OT-I Zellen an verschiedenen Zeitpunkten nach Immunisierung mit LPS und OVA-Peptid wurde in der Milz bestimmt und zeigte keine signifikanten Unterschiede (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung. 5.6: Charakterisierung der OT-I Reaktionen *in vivo* nach i.v. Immunisierung mit OVA<sub>257-264</sub> und LPS.**  $3,5 \times 10^6$  OT-I Zellen wurden adoptiv transferiert. Immunisiert wurde mit 10 µg OVA-Peptid und 50 µg LPS. Sortiert (engl.: *gated*) wurde wie in Abbildung 5.2 gezeigt. In **a**) ist die Kinetik der OT-I Zellpopulationen im Blut nach Immunisierung zu sehen. **b**) zeigt die IFN-γ Produktion der OT-I Zellen aus der Milz an Tag drei nach Immunisierung. In **c**) wird die spezifische Zytotoxizität der OT-I Zellen an Tag drei nach Immunisierung dargestellt. Der Versuch wurde zweimal mit vergleichbaren Ergebnissen wiederholt und mit drei bis fünf Mäusen pro Gruppe durchgeführt. **Kontrolle:** Ausschließlich mit LPS behandelte NTL; **NTL:** CD11c-Rac1(N17)-transgennegative Mäuse (engl.: *nontransgenic littermates*); **Tg<sup>+</sup>:** CD11c-Rac1(N17)-transgene Mäuse.

Der Anteil IFN-γ produzierender OT-I Zellen unterschied sich nicht signifikant in transgenen und nicht-transgenen Rezipienten.  $46,8 \pm 2,8$  % der OT-I Zellen in transgenen Mäusen haben gegenüber  $49,3 \pm 0$  % in nichttransgenen Mäusen IFN-γ produziert (Abb. 5.6 b).

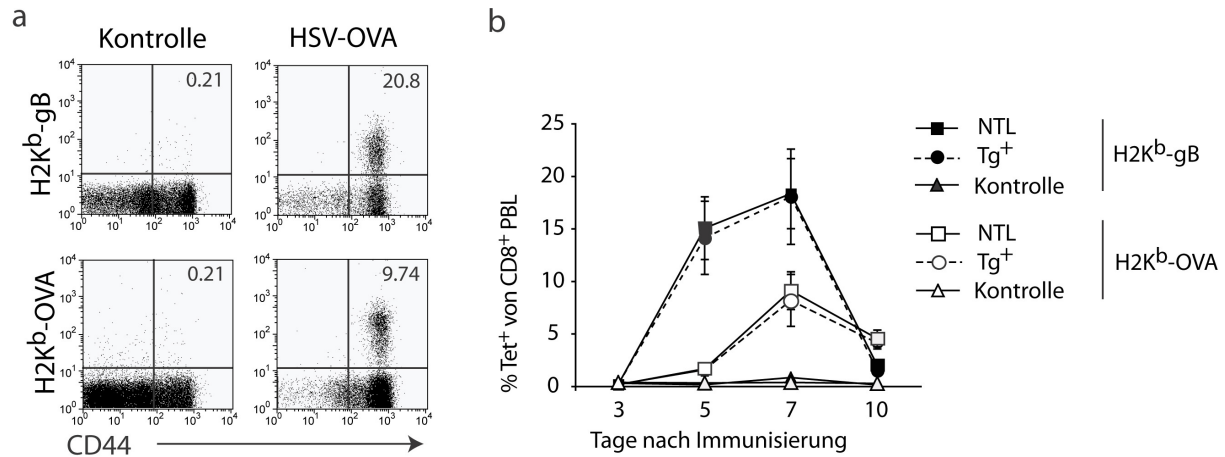
Die funktionelle Zytotoxizität der mit OVA-Peptid aktivierten OT-I Zellen wurde mit einem *in vivo* Zytotoxizitätstest untersucht. Nach einem OT-I Transfer wurden transgene Mäuse und NTL mit OVA<sub>257-264</sub> und LPS immunisiert. Den Versuchstieren wurden an Tag zehn nach Immunisierung jeweils  $20 \times 10^6$  syngene C57BL/6 Milzzellen intravenös verabreicht, die entsprechend 5.1.1 mit Peptid beladen und mit CFSE gefärbt wurden. Elf Stunden nach Transfer dieses Milzzellen-Gemisches in die immunisierten Mäuse wurde mittels FACS Analyse die zytotoxische Eliminierung der CFSE-markierten Zellen ausgewertet (Abb. 5.6 c). Die spezifische Lyse in NTL-Rezipienten betrug  $71 \pm 2,8 \%$ , während sie in CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> Mäusen bei etwa  $80 \pm 5,7 \%$  spezifischer Lyse lag. Der Hintergrund betrug etwa 20 % spezifische Lyse, wie mit nicht immunisierten Kontrollmäusen gezeigt wurde. Aktivierte OT-I Zellen in transgenen und nicht-transgenen Mäusen unterschieden sich damit nicht signifikant in ihrer zytotoxischen Aktivität.

Diese Ergebnisse stehen im Kontrast zu denen in Abschnitt 5.1.1, die auf einer Abhängigkeit von Kreuzpräsentation basieren. Ein genereller Defekt in CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> Mäusen, CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu aktivieren, konnte damit ausgeschlossen werden.

### **5.1.3 Normale *in vivo* Aktivierung spezifischer endogener CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach Immunisierung mit Virus**

Eine weitere Möglichkeit, die direkte Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen in CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> Mäusen zu charakterisieren, war die Immunisierung mit Virus. Bei erfolgter Infektion der DC werden anschließend Virusproteine in deren Zytosol translatiert, welche direkten Zugang zur MHC-Klasse I Beladungsmaschinerie erhalten. Hier wurde das replikationsdefiziente rekombinante Herpes Simplex Virus (HSV-1) verwendet (beschrieben in (Lauterbach et al., 2004), welches effizient DC infiziert (Latchman, 2002). HSV-OVA aktiviert zudem unabhängig von T-Helferzellen OVA-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Lauterbach et al., 2004). Nach i.v. Immunisierung von CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> Mäusen kommt es zu einer viralen Expression von rekombinantem OVA und viralem Glykoprotein B (gB) in allen infizierten Zellen. Die Expansion von endogenen polyklonalen OVA- oder gB-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach direkter Ag-Präsentation kann mit spezifischen MHC-H2K<sup>b</sup>-Pentameren quantifiziert werden (siehe 4.2.2.9). CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> Mäuse sowie NTL wurden i.v. mit  $4 \times 10^6$  infektiösen Einheiten (engl.: *infectious particles*, i.p.) immunisiert. Anschließend wurde zu verschiedenen Zeitpunkten das periphere Blut der Versuchstiere auf den prozentualen Anteil spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen hin analysiert. Als Kontrollmaus dienten

NTL, die nicht immunisiert wurden, um den Hintergrund der Pentameren-Färbung zu bestimmen.



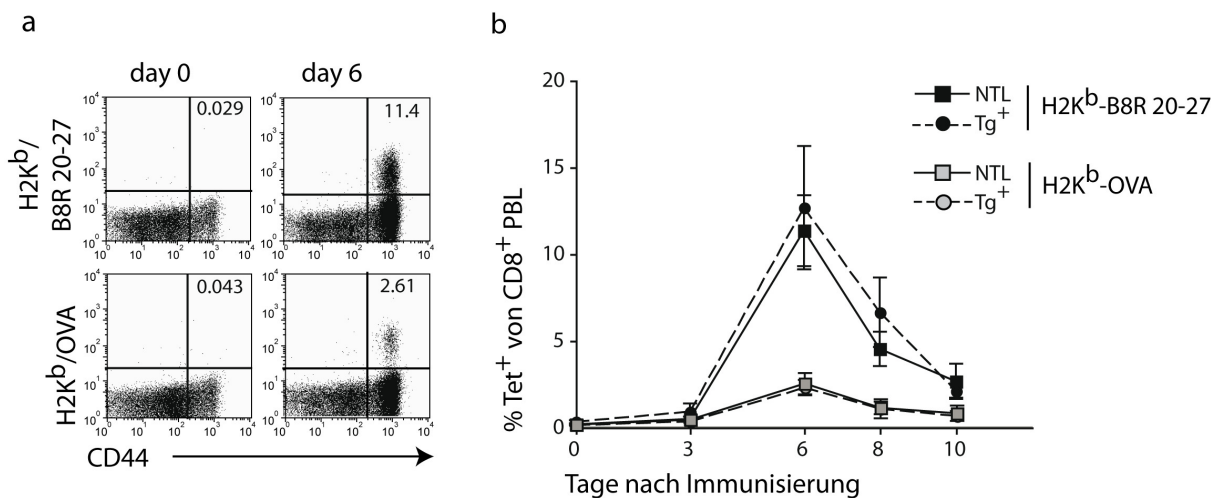
**Abbildung. 5.7: Expansion endogener OVA-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen *in vivo* nach i.v. Immunisierung mit HSV-OVA.** CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> Mäuse und NTL wurden i.v. mit  $4 \times 10^6$  i.p. (engl.: infectious particles) HSV-OVA immunisiert. Es folgte eine Messung der endogenen OVA- bzw. HSV (Glykoprotein B, abgekürzt: gB)-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Blut der Rezipienten zu verschiedenen Zeitpunkten mit Hilfe einer spezifischen Tetrameren-Färbung (**b**). Exemplarisch ist in **a**) der Aktivierungszustand der spezifischen T-Zellen an Tag sieben dargestellt, es wurden zuvor CD8<sup>+</sup> Zellen sortiert. Es wurden fünf Mäuse pro Gruppe verwendet. Diese Ergebnisse sind repräsentativ für zwei Versuche. **Kontrolle:** Nicht mit HSV-OVA behandelte NTL; **NTL:** CD11c-Rac1(N17) -transgenegative Mäuse (engl.: *nontransgenic littermates*); **Tg<sup>+</sup>:** CD11c-Rac1(N17) -transgene Mäuse; **H2K<sup>b</sup>-gB:** HSV-spezifisches Tetramer; **H2K<sup>b</sup>-OVA:** OVA-spezifisches Tetramer.

Wie Abb. 5.7 b) zeigt, erreichte die Expansion OVA- sowie gB-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen in beiden Mausstämmen an Tag sieben ihr Maximum und fiel an Tag zehn auf das Level von nicht immunisierten Mäusen. In CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> Mäusen wurden  $18 \pm 4,5$  % gB- und  $6 \pm 1,9$  % OVA-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Blut nachgewiesen und in nicht-transgenen Rezipienten  $18,3 \pm 3,3$  gB- sowie  $8,08 \pm 0,8$  % OVA-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Damit waren keine signifikanten Unterschiede in Expansion und Kinetik spezifischer CTL vorhanden. Über den gesamten Zeitraum war auch der Aktivierungszustand (CD44<sup>hi</sup>) in OVA- und gB-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen vergleichbar (Daten nicht gezeigt).

Eine weitere Messung endogener spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen erfolgte mittels Immunisierung mit dem OVA-exprimierenden rekombinanten Virus MVA-OVA (MVA vom englischen:



*Modified Vaccinia Ankara*). CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> Mäuse sowie NTL wurden i.v. mit  $4 \times 10^6$  infektiösen Einheiten immunisiert. Spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zell Antworten auf die OVA- und MVA-Epitope (B8R 20-27) waren vergleichbar mit den Ergebnissen des vorherigen Versuches (Abb. 5.7). Die Expansion OVA- sowie MVA-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen erreichte in beiden Mausstämmen an Tag sechs ihr Maximum und fiel etwa an Tag zehn auf das Hintergrundlevel (Abb. 5.8, b). In CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> und nicht-transgenen Rezipienten wurden keine signifikanten Unterschiede in Expansion und Kinetik von spezifischen CTL gefunden, weder für OVA- noch für MVA-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen. An Tag sechs lagen  $12,68 \pm 3,5$  % MVA-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Blut der transgenen Mäuse vor, während es in nicht-transgenen Mäusen  $11,3 \pm 25$  waren. Dahingegen waren  $2,5 \pm 0,4$  OVA-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen in transgenen Mäusen nachweisbar. In nicht-transgenen Mäusen waren es  $2,7 \pm 0,6$  %. Über den gesamten Zeitraum war auch der Aktivierungszustand (CD44<sup>hi</sup>) in OVA- und gB-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen vergleichbar (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung. 5.8: Expansion endogener OVA-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen *in vivo* nach i.v. Immunisierung mit MVA-OVA.** Tg<sup>+</sup>- und NTL-Mäuse wurden i.v. mit  $4 \times 10^6$  i.p. MVA-OVA immunisiert. Es folgte eine Messung der endogenen OVA- bzw. MVA- (B8R 20-27) spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Blut der Rezipienten zu verschiedenen Zeitpunkten mit Hilfe einer spezifischen Tetrameren-Färbung. Zur Bestimmung des Hintergrundes der Tetrameren-Färbung wurde Blut vor der Immunisierung analysiert und mit aufgetragen (Tag 0). Exemplarisch ist in **a**) der Aktivierungszustand der spezifischen T-Zellen an Tag sechs dargestellt, es wurden zuvor CD8<sup>+</sup> Zellen sortiert. In **b**) ist eine Kinetik der OVA- bzw. MVA- spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellzahlen zu sehen. Diese Ergebnisse sind repräsentativ für zwei Versuche mit jeweils fünf Mäusen pro Gruppe. NTL: CD11c-Rac1(N17)-transgennegative Mäuse (engl.: *nontransgenic littermates*); Tg<sup>+</sup>: CD11c-Rac1(N17)-transgene Mäuse; H2K<sup>b</sup>-B8R 20-27: MVA-spezifisches Tetramer; H2K<sup>b</sup>-OVA: OVA-spezifisches Tetramer.

Neben der direkten Präsentation von antigenen Peptiden war auch die direkte Präsentation von viralen Ag und die anschließende Aktivierung von spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> Mäusen nicht inhibiert. Diese Daten bestätigen einen spezifischen Defekt der Kreuzpräsentation in CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> Mäusen, während kein Defekt in der direkten Präsentation MHC-Klasse I restringierter Ag nachweisbar war.

### 5.1.4 Reduzierte *in vivo* Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch Immunkomplexe

Die MHC-Klasse I Präsentation von löslichen Antigenen, die durch Makropinozytose aufgenommen werden, ist nicht sehr effizient. Es müssen relativ große Mengen Ag verabreicht werden, um eine spezifische CTL-Antwort messen zu können. Die Präsentation von solchen Antigenen kann z. B. verbessert werden, indem sie an Partikel adsorbiert werden (Shen et al., 1997), in Bakterien verabreicht werden (Rescigno et al., 1998) oder in apoptotischen Zellen (Jiang et al., 1995). Daneben exprimieren DC Rezeptoren, die die Internalisierung von Ag erleichtern wie die *C-type lectin* Rezeptoren (Sallusto et al., 1995), DEC205 (Jiang et al., 1995) und Rezeptoren für die Fc Domäne (FcR) von Immunglobulinen (Igs) (Sallusto and Lanzavecchia, 1994). Der FcεR bindet IgE wohingegen IgG vom FcγR gebunden wird, der sich auf fast allen Zellen des hämatopoetischen Systems befindet, inklusive den DC. DC, die durch die rezeptorvermittelte Endozytose von Antigen-IgG Komplexen (Immunkomplexen, IK) aktiviert werden, zeigen eine verstärkte MHC-Klasse I restringierte Ag-Präsentation. Diese basiert nicht nur auf der besseren Ag-Aufnahme im Vergleich zu Ag, die durch Makropinozytose aufgenommen werden. Sie ist zudem unabhängig von CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Eine wesentliche Rolle in der verbesserten CTL-Aktivierung durch IK gegenüber LPS könnte die Aktivierung von anderen Transkriptionsfaktoren durch die Signaltransduktion über den FcR spielen (Schuurhuis et al., 2002).

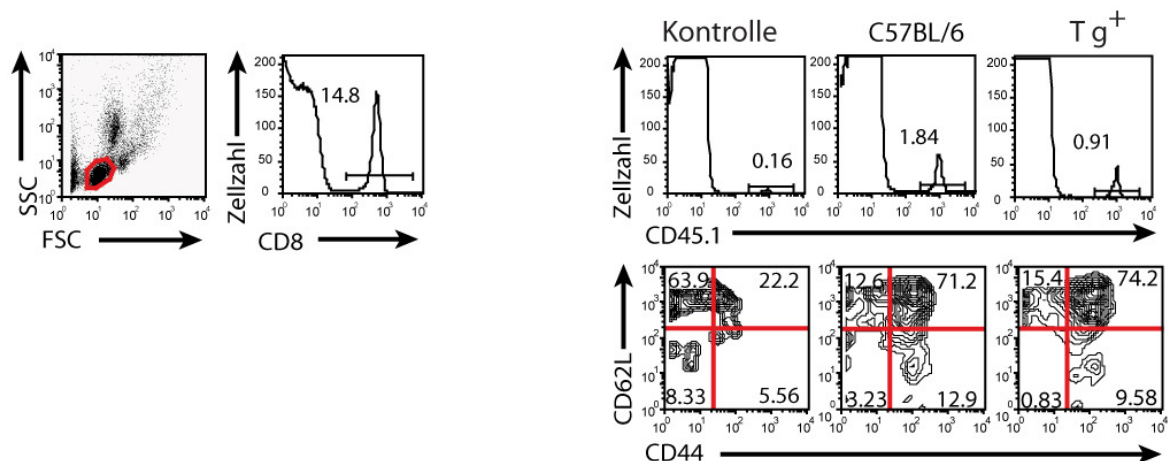
In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob lösliches OVA-Protein *in vivo* auch dann schlechter von transgenen Mäusen kreuzpräsentiert wird, wenn es als Immunkomplex mit OVA-spezifischem IgG (rIgGαOVA) verabreicht wird und von DC endozytiert wird. Dazu wurden CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> und C57BL/6 Mäusen je 5 x 10<sup>5</sup> OT-I Zellen adoptiv transferiert. Am nächsten Tag wurden die nach 4.2.2.12.3 zubereiteten IK i.v. verabreicht. Schuurhuis DH et al. haben ein optimales Verhältnis von 1 µg OVA und 25 µg rIgGαOVA austitriert. In der vorliegenden Arbeit wurde weiterhin austitriert, dass 1 µg OVA in Form von IK pro Maus noch ausreichend ist, um eine CD8<sup>+</sup> T-Zell Antwort nachzuweisen (Daten nicht

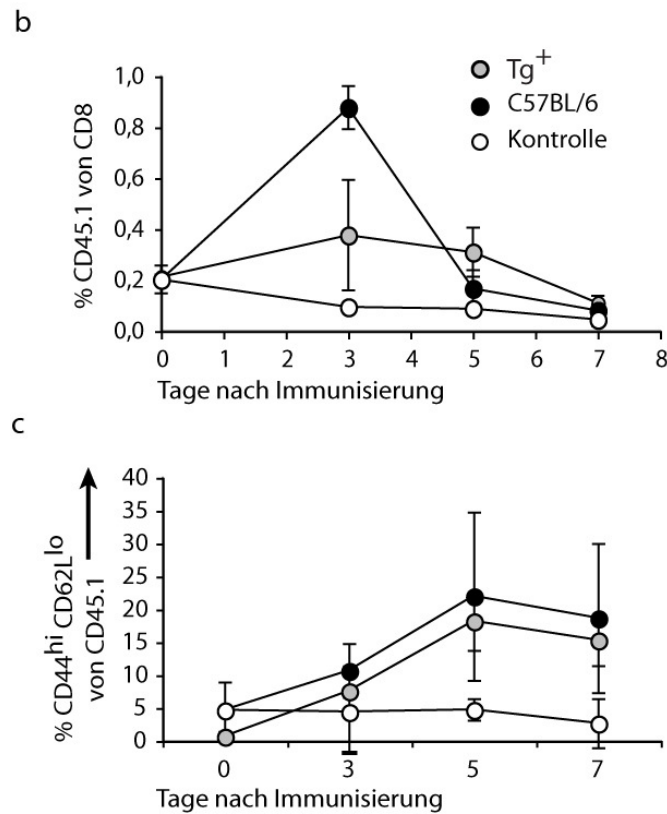
gezeigt). Eine Kontrollgruppe erhielt ein Gemisch aus 1 µg OVA und unspezifischem IgG. Hintergrundwerte wurden an Tag 0 vor der Immunisierung gemessen.

Wie in Abb. 5.9 b) zu sehen ist, wurde das Expansionsmaximum von OT-I Zellen in beiden Versuchsgruppen an Tag drei erreicht. An Tag sieben sank die Expansion auf den Hintergrundwert ab. Während in C57BL/6 Mäusen an Tag drei  $0,9 \pm 0,09$  % aller CD8<sup>+</sup> T-Zellen OT-I Zellen waren, gab es in transgenen Mäusen mit  $0,38 \pm 0,2$  % nur eine auf ein drittel reduzierte Menge an OT-I Zellen. Der Unterschied war mit  $p = 0,02$  signifikant, ein Anstieg an OT-I Zellen in CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> Mäusen gegenüber C57BL/6 Mäusen war mit  $p = 0,18$  nicht signifikant und befnd sich demnach kaum über dem Hintergrundlevel. Die Hintergrundwerte lagen über den gesamten Zeitraum etwa zwischen 0 und 0,2 %. Abb.5.9 c) zeigt eine Kinetik der Aktivierungsmarker CD44 und CD62L auf OT-I Zellen. Der Anteil voll aktivierter OT-I Zellen in C57BL/6 Mäusen steigt bis auf ein Maximum von  $21,9 \pm 12,8$  % an Tag fünf, während transgene Mäuse einen leicht reduzierten (nicht signifikanten) Anteil von  $18,2 \pm 4,4$  % aufweisen.

Diese Daten bestätigen einen spezifischen Defekt der Kreuzpräsentation in CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> Mäusen, der nicht auf eine verminderte Pinozytose durch DC beschränkt ist. Vielmehr zeigte sich auch eine stark verminderte Fähigkeit zur Kreuzpräsentation nach der Ag-Aufnahme durch rezeptorvermittelte Endozytose.

a



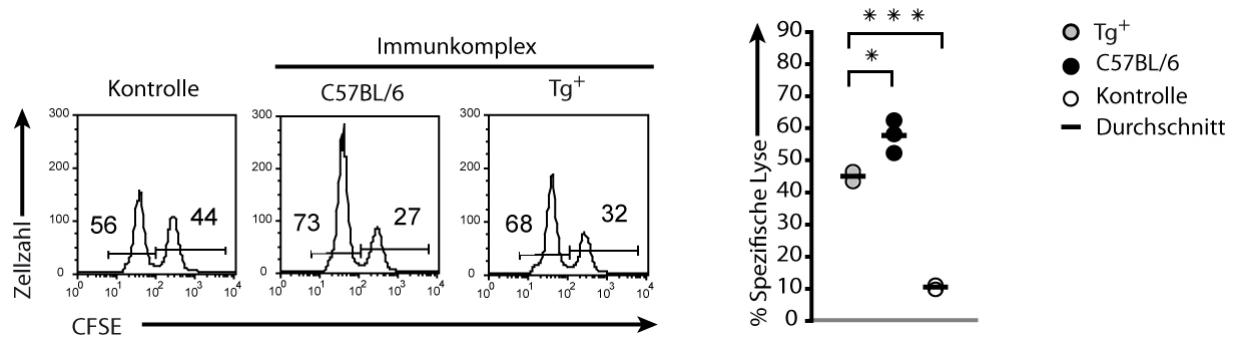


**Abbildung. 5.9: *In vivo* Proliferation von OT-I Zellen in CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> Mäusen nach Immunisierung mit Immunkomplexen.**  $5 \times 10^5$  OT-I Zellen wurden adoptiv transferiert. Immunisiert wurde mit  $1 \mu\text{g}$  OVA-Protein, verabreicht als Immunkomplex. **a)** zeigt beispielhaft für Tag 3 nach Immunisierung, wie sortiert wurde. **b)** zeigt die Kinetik der OT-I Zell-Populationen im Blut nach erfolgreicher Immunisierung und **c)** eine Kinetik der Aktivierungsmarker CD44 und CD62L. Der Versuch wurde dreimal mit vergleichbaren Ergebnissen ausgeführt und mit drei Mäusen pro Gruppe durchgeführt. **Kontrolle:** Immunisierung nichttransgener Wildtypmäuse (C57BL/6) mit OVA-Protein, welches zuvor mit unspezifischem IgG inkubiert wurde; **tg<sup>+</sup>:** CD11c-Rac1(N17)-transgene Mäuse.

Die funktionelle Zytotoxizität der mit Immunkomplexen aktivierten OT-I Zellen wurde mit einem *in vivo* Zytotoxizitätstest untersucht. Den Versuchstieren wurden an Tag drei nach Immunisierung jeweils  $20 \times 10^6$  syngene C57BL/6 Milzzellen intravenös verabreicht, die wie oben beschrieben mit dem OVA-Peptid SIINFELK beladen und mit CFSE markiert wurden. Acht Stunden nach Transfer dieses Milzzellen-Gemisches in die immunisierten Mäuse wurde mittels FACS Analyse die zytotoxische Eliminierung der CFSE-markierten Zellen ausgewertet.

Die spezifische Lyse in C57BL/6-Rezipienten betrug  $57,7 \pm 5,1 \%$ , während OT-I Zellen in CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> Mäusen mit  $45 \pm 1,5 \%$  spezifischer Lyse ca. 25 % weniger effizient waren (Abb. 5.10). Der Hintergrund betrug  $10,4 \pm 1 \%$  spezifische Lyse, wie mit Mäusen, die

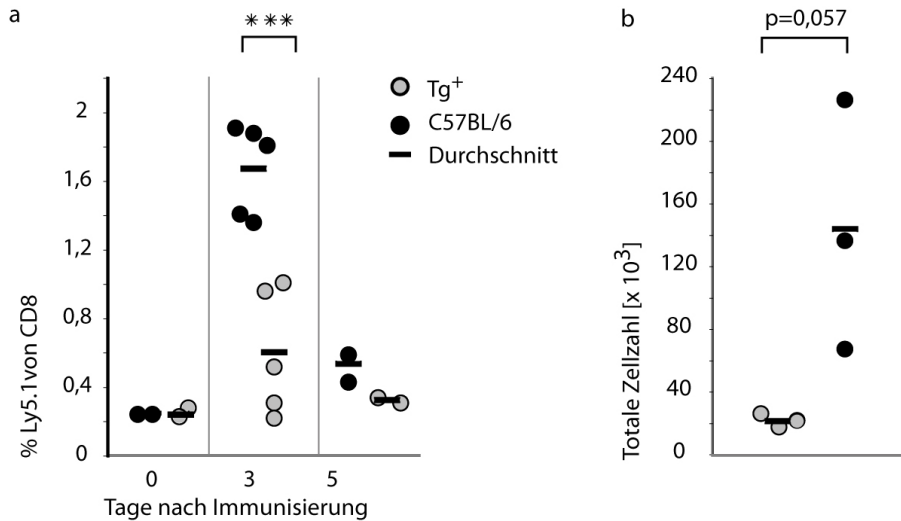
unspezifisches rIgG erhielten, gezeigt wurde. Die spezifische Lyse war damit in transgenen Mäusen mit  $p = 0,015$  signifikant reduziert, während der Unterschied der transgenen Mäuse zur Kontrollgruppe mit  $p = 0,0001$  extrem signifikant war.



**Abbildung. 5.10: *In vivo* Zytotoxizitätstest an Tag 3 nach i.v. Immunisierung mit Immunkomplexen.**  $5 \times 10^5$  OT-I Zellen wurden adoptiv transferiert. Immunisiert wurde mit  $1 \mu\text{g}$  OVA-Protein in Form von Immunkomplexen. Als **Kontrolle** für den Zytotoxizitätstest dienten Rezipienten, denen OVA i.v. injiziert wurde, welches zuvor mit unspezifischem IgG inkubiert wurde. Als Kontrolle dienten auch unbehandelte C57BL/6-Mäuse (Daten nicht gezeigt). Die spezifische Lyse ist für jeweils drei Mäuse pro Gruppe dargestellt. In einem weiteren Versuchen wurden vergleichbare Ergebnisse ermittelt. **Tg<sup>+</sup>**: CD11c-Rac1(N17) -transgene Mäuse. \* = signifikant; \*\*\* = extrem signifikant, siehe auch Statistikkapitel 4.3.

### 5.1.5 Reduzierte *in vivo* Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch OVA-Partikel

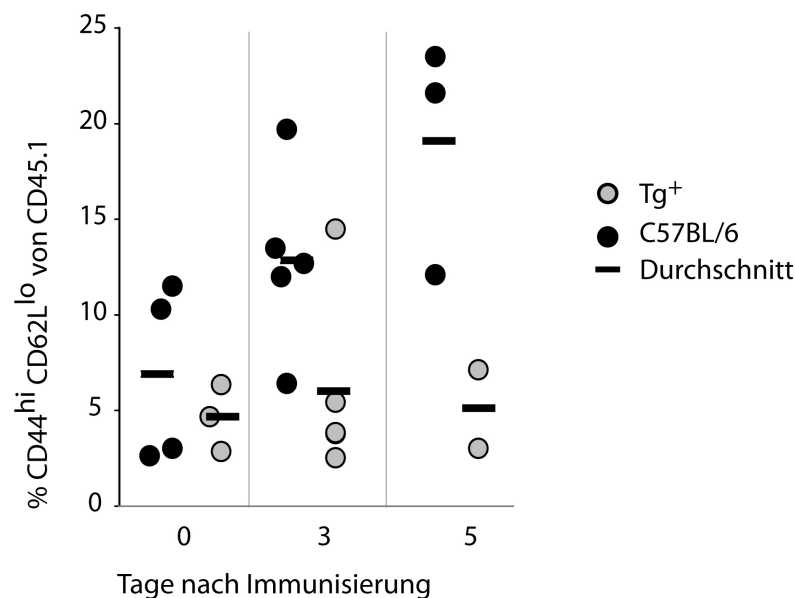
Partikuläre Antigene wie Bakterien, apoptotische Zellen und Ag-konjugierte Partikel werden von DC phagozytiert. OVA-konjugierte Partikel wurden daher verwendet, um die *in vivo* Kreuzpräsentation in transgenen Mäusen im Licht phagozytierter Antigene zu betrachten. Dazu wurden Polystyrenpartikel mit einem Durchmesser von  $1,8 \mu\text{m}$  verwendet, an die sich Proteine leicht durch kovalente Bindung anbringen lassen. Entsprechend dem Protokoll 4.2.2.12.4 wurde eine Lösung mit Konjugaten hergestellt, von der pro Maus  $200 \mu\text{l}$  i.v. injiziert wurde. Ein Tag zuvor wurden je  $5 \times 10^5$  OT-I Zellen adoptiv transferiert.



**Abb. 5.11: *In vivo* Proliferation OVA-spezifischer T-Zellen nach einer Immunisierung mit OVA-konjugierten Partikeln.**  $5 \times 10^5$  OT-I Zellen wurden adoptiv transferiert. Immunisiert wurde mit  $30 \mu\text{g}$  OVA-Protein, verabreicht als Komplex mit Polystyrenpartikeln. **a)** zeigt den Anteil der OT-I Zellen von CD8<sup>+</sup> PBL an Tag null, drei und fünf nach Immunisierung und **b)** die totalen Zellzahlen in der Milz an Tag drei nach Immunisierung. Der Versuch wurde zweimal mit drei bis fünf Mäusen pro Gruppe mit ähnlichen Ergebnissen durchgeführt. Kontrollwerte wurden erzielt durch die Immunisierung mit Partikeln, welche zuvor an BSA statt an OVA-Protein gebunden wurde (Daten nicht gezeigt). Tg<sup>+</sup>: CD11c-Rac1(N17)-transgene Mäuse; \*\*\* = extrem signifikant, siehe auch Statistikkapitel 4.3.

Wie in Abb. 5.11 zu sehen ist, wurde das Expansionsmaximum von OT-I Zellen im Blut in beiden Versuchsgruppen an Tag drei erreicht. An Tag sieben sank die Expansion auf den Hintergrundwert ab, wie aus einem weiteren Experiment ersichtlich wurde (Daten nicht gezeigt). Während in C57BL/6 Mäusen an Tag drei  $1,7 \pm 0,3 \%$  aller CD8<sup>+</sup> T-Zellen OT-I Zellen waren, gab es in transgenen Mäusen mit  $0,6 \pm 0,3 \%$  nur eine auf ein Drittel reduzierte Menge an OT-I Zellen (Abb. 5.11 a). Der Unterschied war mit  $p = 0,0007$  extrem signifikant. Dabei lagen die Hintergrundwerte über den gesamten Zeitraum zwischen 0 und 0,2 % (Daten nicht gezeigt). Die Unterschiede in transgenen und nicht-transgenen Mäusen spiegeln sich auch in den absoluten Zellzahlen wieder, die an Tag drei nach Immunisierung in der Milz gemessen wurden. Während in der Milz von C57BL/6 Mäusen  $1,4 \pm 0,8 \times 10^5$  OT-I Zellen wieder gefunden wurden, waren es in transgenen Mäusen  $22 \pm 0,4 \times 10^3$  OT-I Zellen (Abb. 5.11 b). Mit  $p = 0,057$  ist dieser Unterschied nicht mehr signifikant, jedoch liegt das an den relativ unterschiedlichen Werten, die aus der NTL Gruppe erzielt wurden. Alle Werte liegen über denen, die aus der transgenen Gruppe ermittelt wurden.

In Abb.5.12 ist die Aktivierung ( $CD44^{hi}$  und  $CD62L^{lo}$ ) der transferierten OT-I Zellen an drei verschiedenen Zeitpunkten dargestellt. Der Anteil voll aktivierter OT-I Zellen in C57BL/6 Mäusen steigt bis auf ein Maximum von  $19,1 \pm 6,1$  % an Tag fünf, während transgene Mäuse einen auf ein drittel reduzierten Anteil von  $5,1 \pm 2,9$  % aufweisen. Dieser Unterschied ist nach dem t-Test mit  $p = 0,06$  gerade nicht mehr signifikant, jedoch liegen auch hier wieder alle von NTL ermittelten Werte im Einzelnen über denen, die aus der transgenen Gruppe stammen. Diese Daten bestätigen auch eine verminderte Fähigkeit der Kreuzpräsentation in  $CD11c$ - $Rac1(N17)$   $Tg^+$  Mäusen nach einer Ag-Aufnahme durch Phagozytose.

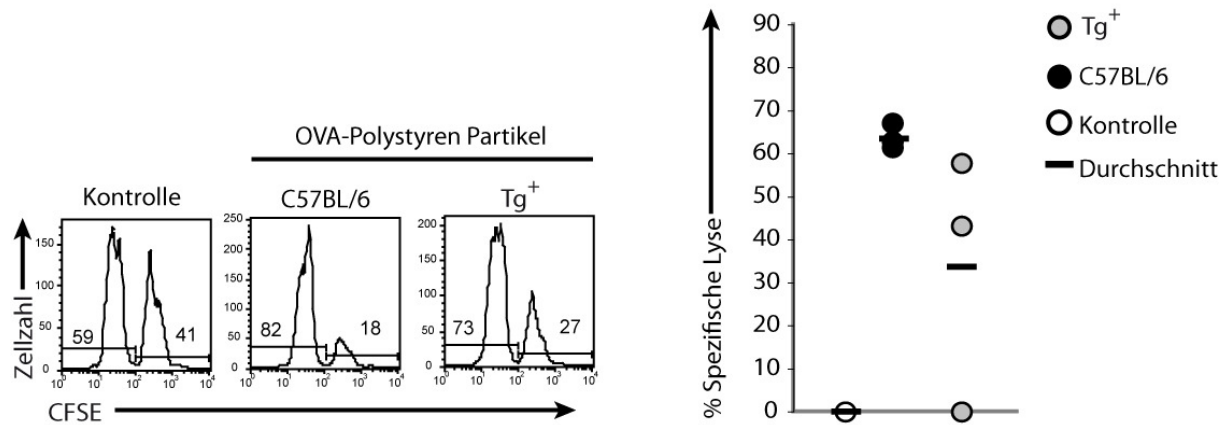


**Abbildung. 5.12: *In vivo* Aktivierung von OT-I Zellen nach einer Immunisierung mit OVA-konjugierten Partikeln.**  $5 \times 10^5$  OT-I Zellen wurden zuvor adoptiv in  $Tg^+$ - und C57BL/6-Mäuse transferiert. Die Abb. zeigt den Aktivierungszustand der transferierten OT-I Zellen drei Tage nach Immunisierung mit  $30 \mu g$  OVA-konjugierten Partikeln. Der Versuch wurde zweimal mit drei bis fünf Mäusen pro Gruppe mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt. Kontrollwerte wurden erzielt durch die Immunisierung mit Partikeln, welche zuvor an BSA statt an OVA-Protein gebunden wurde (Daten nicht gezeigt).  $Tg^+$ :  $CD11c$ - $Rac1(N17)$ -transgene Mäuse.

Die funktionelle Zytotoxizität der mit OVA-Partikeln aktivierten OT-I Zellen wurde mit einem *in vivo* Zytotoxizitätstest an Tag drei nach Immunisierung untersucht (Abb. 5.13). Acht Stunden nach Transfer wurde mittels FACS Analyse die zytotoxische Eliminierung der CFSE-markierten Zellen ausgewertet.

Die spezifische Lyse in C57BL/6-Rezipienten betrug  $61,9 \pm 3,1$  %, während OT-I Zellen in  $CD11c$ - $Rac1(N17)$   $Tg^+$  Mäusen mit  $31,9 \pm 28$  % spezifischer Lyse im Durchschnitt um die Hälfte weniger effizient waren. Im Einzelnen lagen die Werte jeweils weit auseinander, daher

war die spezifische Lyse nach dem t-Test in transgenen Mäusen nicht signifikant reduziert ( $p = 0,078$ ). Die Werte liegen jedoch alle unter denen, die aus der Gruppe nicht-transgener Mäuse erzielt wurden. Der Hintergrund betrug 0% spezifische Lyse, wie mit Mäusen, die BSA-konjugierte Partikel erhielten, gezeigt wurde.



**Abb. 5.13: *In vivo* Zytotoxizitätstest an Tag 3 nach Immunisierung mit OVA-konjugierten Partikeln.**  $5 \times 10^5$  OT-I Zellen wurden adoptiv transferiert. Immunisiert wurde mit ca. 30  $\mu\text{g}$  OVA-Protein in Form von Komplexen mit Polystyrenpartikeln. Als **Kontrolle** für den Zytotoxizitätstest dienten C57BL/6-Rezipienten, denen Polystyrenpartikel injiziert wurden, welche zuvor an BSA anstatt an OVA-Protein gebunden wurden sowie unbehandelte C57BL/6 (nicht gezeigt). Die spezifische Lyse ist für jeweils drei Mäuse pro Gruppe dargestellt. In einem weiteren Versuchen wurden vergleichbare Ergebnisse ermittelt. **Tg<sup>+</sup>**: CD11c-Rac1(N17)-transgene Mäuse.

Diese Daten lassen vermuten, dass der spezifische Defekt der Kreuzpräsentation in CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> Mäusen unabhängig ist von der Art der Aufnahme von exogenen Antigenen. Im Fall der Makropinozytose, der Phagozytose sowie der rezeptorvermittelten Endozytose wurden weniger spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen im peripheren Blut sowie in der Milz nachgewiesen. Diese T-Zellen waren nicht voll aktiviert, wie es die T-Zellen in nichttransgenen Mäusen waren. Weiterhin zeigten die transferierten aktivierten OT-I Zellen in CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> Mäuse in einem *in vivo* Zytotoxizitätstest weniger Funktionalität als in nichttransgenen Mäusen. Die CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> Mauslinie eignet sich demnach wahrscheinlich für Kreuzpräsentationsversuche, unabhängig von der Art, wie exogene Antigene internalisiert werden.



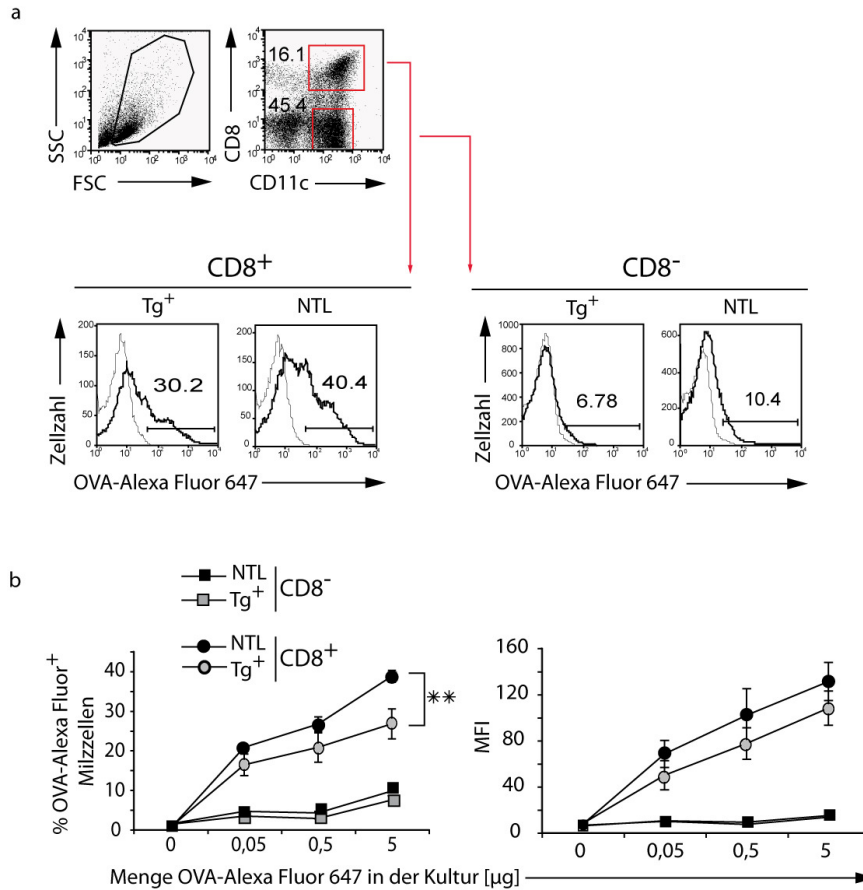
### 5.1.6 Reduzierte *in vitro* Aufnahme von löslichem OVA

Fraglich ist jedoch, ob die verminderte Kreuzpräsentation lediglich darauf basiert, dass in CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> Mäusen weniger Antigene von kreuzpräsentierenden CD8<sup>+</sup> DC internalisiert werden. Eine verminderte *in vivo* Ag-Aufnahme von OVA-FITC durch Makropinozytose wurde in transgenen Mäusen bereits beschrieben (Kerksiek et al., 2005). Im Zusammenhang mit Phagozytose wurde eine Aktinpolymerisations-abhängige Formation von Phagosomen bestätigt (Seastone et al., 1999). Es ist vorstellbar, dass auch während der Prozessierung und MHC-Beladung mit antigenen Peptiden Aktin-abhängige Prozesse ablaufen, die in transgenen Mäusen beeinträchtigt sind. Um zu untersuchen, ob die eingeschränkte Fähigkeit der Kreuzpräsentation in CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> Mäusen nur auf verminderte Ag-Aufnahme basiert, wurde die Menge internalisierten OVA-Proteins in DC *in vitro* gemessen. Dazu wurden zunächst CD8<sup>+</sup> sowie CD8<sup>-</sup> DC aus Milzen von transgenen Mäusen getrennt für zwei Stunden mit OVA inkubiert, das an den Fluoreszenzfarbstoff Alexa-Fluor 647 konjugiert war. Dazu wurden jeweils  $2 \times 10^5$  DC in ein Loch einer 24-Lochplatte ausplattiert und mit verschiedenen Mengen OVA-Alexa-Fluor 647 behandelt. Danach wurden die Zellen mit CD8 und CD11c gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

In Abb. 5.14 a) ist beispielhaft zu sehen wie die unterschiedlichen Zellfraktionen zur Analyse sortiert (engl.: *gating*) wurden. Die Histogramme zeigen eine Überlappung von DC, die mit 0 µg OVA-Alexa-Fluor 647 (linke, dünne Linie) und mit 5 µg OVA-Alexa-Fluor 647 inkubiert wurden. Zusammenfassend ist in Abb. 5.14 b) dargestellt, wie sich die OVA-Alexa-Fluor 647 Aufnahme durch CD8<sup>+</sup> und CD8<sup>-</sup> DC bei verschiedenen Ag-Konzentrationen verhielt. Bereits ab 0,5 µg OVA-Alexa-Fluor 647 pro ml ist in transgenen und nichttransgenen Mäusen eine OVA-Aufnahme bei 18-20 % aller CD8<sup>+</sup> DC zu verzeichnen. 4 % aller CD8<sup>-</sup> DC von beiden Mausgruppen nahmen OVA auf. Bei einer Menge OVA-Alexa-Fluor 647 von 5 µg pro ml haben im Durchschnitt  $38,7 \pm 1,5$  % aller nichttransgenen CD8<sup>+</sup> DC OVA aufgenommen und  $26,7 \pm 3,7$  % aller transgenen DC. Dieser Unterschied ist mit  $p = 0,0069$  hoch signifikant.  $9,7 \pm 1$  % aller nichttransgenen CD8<sup>-</sup> DC haben im Durchschnitt OVA aufgenommen, wenn 5 µg OVA-Alexa-Fluor 647 pro ml verabreicht wurden und  $7,5 \pm 0,6$  % aller transgenen DC. Dieser Unterschied ist nicht signifikant.

Bei einer Auswertung der mittleren Fluoreszenzintensität (engl.: *mean fluorescence intensity*, MFI), die ein Maß für die durchschnittlich gebundene Menge Fluoreszenzfarbstoff pro Partikel ist, sieht man, dass CD8<sup>+</sup> DC von transgen-negativen Mäusen einen MFI Wert von  $131 \pm 16,5$  bei 5 µg OVA-Alexa Fluor 647 erreichen und transgene Mäuse einen von

$107 \pm 14,8$ . Ein signifikanter Unterschied wurde damit nicht festgestellt. Außerdem wurde kein Unterschied hinsichtlich der Auswertung der MFI Werte von CD8<sup>-</sup> DC festgestellt. Er lag für beide Gruppen etwa bei 14.

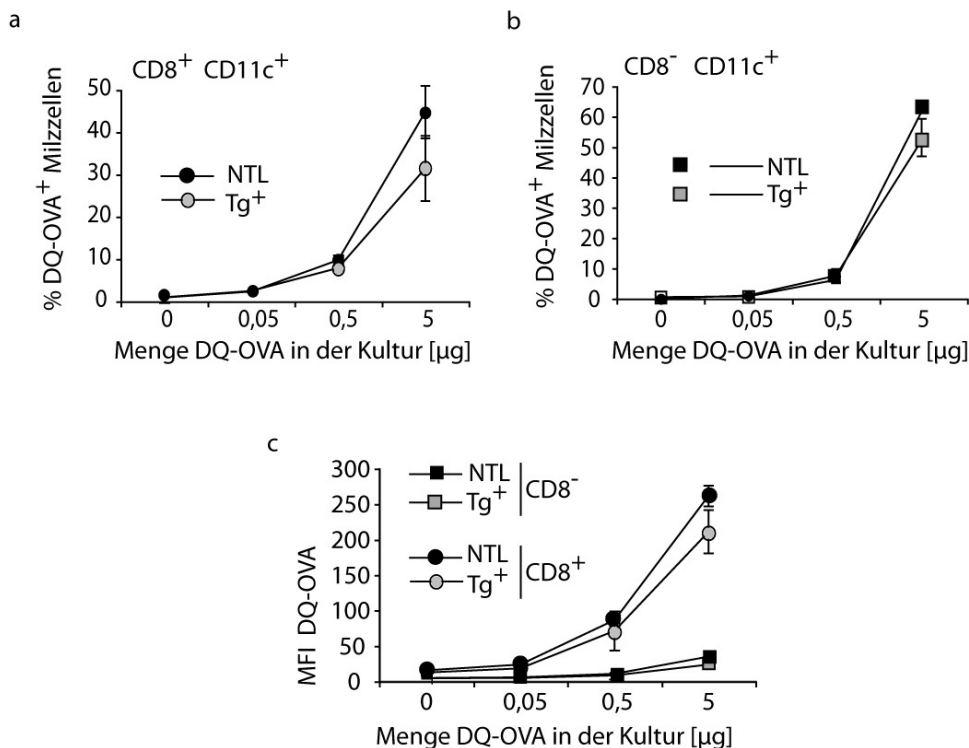


**Abb. 5.14: In vitro Endozytose von OVA-Alexa Fluor 647 durch CD8<sup>+</sup> und CD8<sup>-</sup> DC.** CD11c<sup>+</sup> DC wurden aus Milzen von Tg<sup>+</sup>-Mäusen und NTL isoliert. Jeweils  $2 \times 10^5$  DC wurden pro Loch einer 24-Loch-Platte ausplattiert und mit unterschiedlichen Mengen OVA-Alexa Fluor 647 für zwei Stunden im Brutschrank inkubiert. Die Diagramme in **b**) zeigen den prozentualen Anteil OVA-Alexa Fluor-positiver DC und die jeweilige mittlere Fluoreszenzintensität (engl.: *mean fluorescence intensity*, MFI) von je drei Mäusen. Die Histogramme in **a**) zeigen die OVA-Alexa Fluor 647-Aufnahme durch DC, die 0 µg (dünne Linie links) bzw. 5 µg OVA-Alexa Fluor 647 (dicke Linie rechts) in der Kultur erhielten. Der Versuch ist repräsentativ für drei Mäuse pro Gruppe in zwei Durchgängen. NTL: CD11c-Rac1(N17)-transgennegative Mäuse (engl.: *nontransgenic littermates*); Tg<sup>+</sup>: CD11c-Rac1(N17)-transgene Mäuse; \*\* = hoch signifikant, siehe auch Statistikkapitel 4.3.

### 5.1.7 In vitro Prozessierung von löslichem OVA

Parallel zu diesem Experiment wurde untersucht, wie viel OVA in den einzelnen DC-Subtypen nicht nur internalisiert sondern auch prozessiert wurde. Zu diesem Zweck wurde

DQ-OVA verwendet. DQ-OVA ist ein Ligand des Makrophagen-Mannose-Rezeptors, der aus natürlich mannosyliertem OVA besteht, DQ-OVA tritt also über den Mannose-Rezeptor in die Dendritische Zelle ein. DQ-OVA ist ein aus 385 Aminosäuren bestehendes, 45 kD schweres Protein, das stark mit dem Fluorochrom BODIPY besetzt ist. Die Fluorochrome unterliegen einer gegenseitigen sterischen Störung (gequenchte Fluoreszenz), so dass nur 3 % der möglichen Fluoreszenz im vollständigen Protein aktiv sind. Erst die Degradation des Proteins vereinzelt (entquencht) die Fluorochrome, was mit einer starken Steigerung der Fluoreszenzemission der Probe verbunden ist. Nur OVA-Protein, das internalisiert und prozessiert worden ist, fluoresziert demnach.



**Abb. 5.15: In vitro Prozessierung von DQ-OVA durch  $CD8^+$  und  $CD8^-$  DC.** Milzen von Tg<sup>+</sup>- und NTL-Mäusen wurden entsprechend der angegebenen Protokolle (4.2.2.2.2 und 4.2.6) behandelt, um  $CD11c^+$  DC aus ihnen zu isolieren. Jeweils  $2 \times 10^5$  DC wurden pro Loch einer 24 Loch-Platte ausplattiert und mit unterschiedlichen Mengen DQ-OVA für zwei Stunden im Brutschrank inkubiert. Es folgte eine Färbung mit  $CD11c$  und  $CD8$ , um die entsprechenden DC-Subtypen auf die Menge prozessierten DQ-OVAs hin untersuchen zu können. Die Daten von jeweils drei Mäusen und verschiedenen DQ-OVA Mengen sind zusammengefasst. Sie zeigen den prozentualen Anteil DQ-OVA positiver DC (**a** und **b**) und die jeweilige mittlere Fluoreszenzintensität (engl.: *mean fluorescence intensity*, MFI, **c**). NTL:  $CD11c$ -Rac1(N17)-transgennegative Mäuse (engl.: *nontransgenic littermates*); Tg<sup>+</sup>:  $CD11c$ -Rac1(N17)-transgene Mäuse.

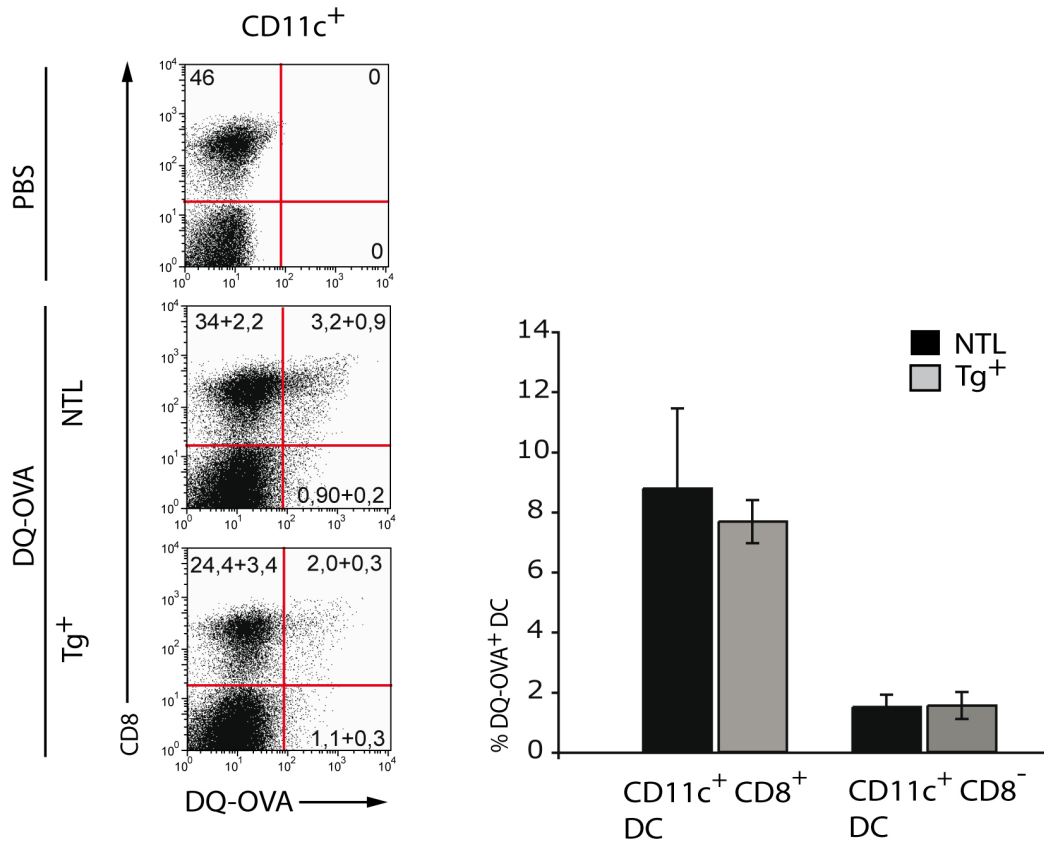
Bereits ab 0,5  $\mu$ g DQ-OVA pro ml ist in transgenen und nichttransgenen DC eine OVA-Aufnahme bei ca. 8 % aller  $CD8^+$  DC zu verzeichnen gewesen (Abb. 5.15). In etwa das

Gleiche gilt für CD8<sup>-</sup> DC. Bei einer Menge DQ-OVA von 5 µg/ml haben im Durchschnitt  $44,8 \pm 6,2$  % aller nichttransgenen CD8<sup>+</sup> DC OVA aufgenommen und  $31,5 \pm 7,7$  % aller transgenen DC. Diese offensichtliche Reduktion ist jedoch nicht signifikant.  $62,9 \pm 1,6$  % aller nichttransgenen CD8<sup>-</sup> DC haben im Durchschnitt OVA aufgenommen, wenn 5 µg DQ-OVA pro ml verabreicht wurden und  $53,1 \pm 6,2$  % aller transgenen DC. Auch dieser Unterschied ist nicht signifikant. Auch wenn man die mittlere Fluoreszenzintensität auswertet, dann bestätigen sich die Ergebnisse. Vergleichbare Ergebnisse wurden jeweils in zwei unabhängigen Versuchen ermittelt. In einem dritten vergleichbaren Versuch wurde jedoch bei einer Menge von 5 µg DQ-OVA pro ml eine verminderte Aufnahme durch transgene Mäuse gesehen, die mit  $p = 0,002$  hoch signifikant war. Ein Ergebnis lässt sich daraus zwar nicht eindeutig interpretieren, weil die Reduktion der DQ-OVA Aufnahme nicht in allen Fällen signifikant war, jedoch scheint es insgesamt, dass die Ag-Prozessierung in transgenen CD8<sup>+</sup> DC bei relativ hohen Mengen (ab 5 µg DQ-OVA) *in vitro* leicht reduziert sein könnte.

### 5.1.8 *In vivo* Prozessierung von löslichem OVA

Die Menge OVA, die in DC prozessiert wird, wurde auch *in vivo* genauer untersucht. Transgenen und nicht-transgenen Mäusen wurden dazu jeweils 400 µg DQ-OVA i.v. injiziert. Nach sechs Stunden wurden den Versuchstieren die Milzen entnommen. DC wurden isoliert und mit den Antikörpern CD11c und CD8 markiert sowie durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 5.16 links).

In den Quadranten oben rechts sind die CD11c<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> DC und im Quadranten unten rechts die CD11c<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> DC zu sehen, die OVA internalisiert und prozessiert haben. Eine Zusammenfassung von drei Mäusen pro Gruppe ist im Balkendiagramm (Abb. 5.16 rechts) zu sehen.  $8,8 \pm 2,6$  % aller CD11c<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> DC von CD8 waren DQ-OVA positiv in nichttransgenen Mäusen, während es  $7,7 \pm 0,7$  % in transgenen Mäusen waren. Dies stellt einen nicht signifikanten Unterschied dar. Analog dazu waren in beiden Versuchsgruppen ca. 1,5 % aller CD11c<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> DC von allen CD8<sup>-</sup> DQ-OVA positiv. Auch die CD8<sup>-</sup> DC zeigten damit keine signifikant unterschiedliche Ag-Prozessierung in beiden Mausgruppen. Damit konnte in der vorliegenden Arbeit eine signifikante Reduzierung in der Prozessierung von exogenen OVA-Proteinen durch CD8<sup>+</sup> DC *in vivo* nicht eindeutig gezeigt werden.

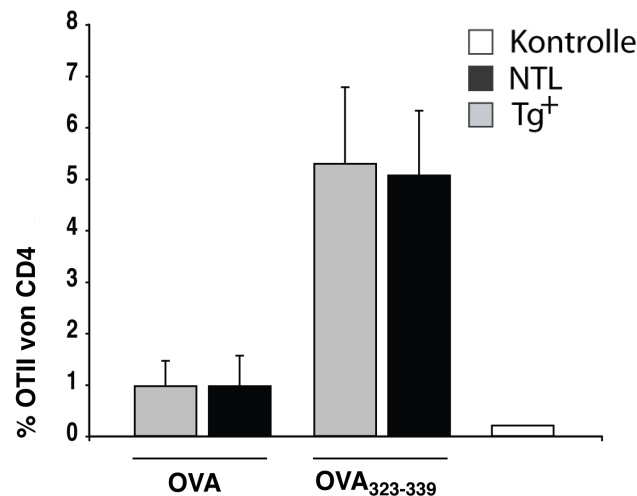


**Abb. 5.16: *In vivo* Endozytose von DQ-OVA durch CD8<sup>+</sup> und CD8<sup>-</sup> DC.** Tg<sup>+</sup>- und NTL-Mäuse erhielten i.v. je 400 µg DQ-OVA. Milz-DC wurden 6 Stunden später analysiert. In den Quadranten der *Dotplots* sind jeweils CD8<sup>+</sup> (Quadrant oben rechts) und CD8<sup>-</sup> (Quadrant unten rechts) DC zu sehen, die DQ-OVA endozytiert haben. Ergebnisse von drei Mäusen pro Gruppe sind in dem Balkendiagramm (rechts) zusammengefasst. Angegeben sind hier DQ-OVA<sup>+</sup> DC von CD8<sup>+</sup> bzw. DQ-OVA<sup>+</sup> DC von CD8<sup>-</sup>. Als Kontrolle dienten Mäuse, denen lediglich PBS injiziert wurde, um den Hintergrund zu messen. Zwei vergleichbare Versuche wurden durchgeführt.

### 5.1.9 Normale *in vivo* Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch lösliches OVA

Mit dem Hintergrund, dass effektive CTL Antworten häufig abhängig sind von der CD4<sup>+</sup> T-Zell Hilfe, wurde in Erwägung gezogen, OVA-spezifische CD4 T-Zell Antworten in CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> Mäusen zu untersuchen. Es sollte damit erarbeitet werden, ob sich auch die Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch OVA-Peptide oder -Proteine in Rac1-defizienten Mäusen von der in Wildtypmäusen unterscheidet. Es wurde die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass sich in defekten DC die aufgenommenen Antigene in Phagolysosomen ansammeln könnten weil die Aktin-Reorganisation gestört ist. Somit bestünde theoretisch die Möglichkeit, dass degradierte Antigene in transgenen Mäusen vermehrt im Kontext von

MHC-Klasse II präsentiert werden und  $CD4^+$  T-Zellen aktiviert werden. Für diesen Versuch wurden OT-II Mäuse verwendet, die transgen für einen TCR sind, der das Peptid OVA<sub>323-339</sub> im Kontext von MHC-Klasse II erkennt. Pro Maus wurden  $4 \times 10^6$  OT-II Zellen i.v. injiziert. Einen Tag später wurden die Mäuse mit 100  $\mu$ g OVA-Protein oder 10  $\mu$ g OVA<sub>323-339</sub> und 10  $\mu$ g LPS immunisiert. Da sich  $CD4^+$  T-Zellen im Blut kaum nachweisen lassen, wurden zum Nachweis von Proliferation die Milzen entnommen. Milzzellen wurden mit den Antikörpern  $\alpha\alpha 2$ ,  $\alpha\beta 5.1/5.2$  und CD4 gefärbt und durchflusszytometrisch bestimmt. Ein Expansionsmaximum wird an Tag vier erreicht (Daten nicht gezeigt). An Tag drei nach Protein-Immunisierung wurden in transgenen Tieren  $0,97 \pm 0,5$  % OT-II Zellen von  $CD4$  Milzzellen gesehen (Abb. 5.17) und in nicht-transgenen Tieren  $0,97 \pm 0,4$  %. Nach einer OVA<sub>323-339</sub> Immunisierung wurden in transgenen Mäusen  $5,06 \pm 1,2$  % OTII-Zellen gemessen und in transgenen Mäusen eine vergleichbare Menge von  $5,28 \pm 1,4$  %. Damit konnten keine Unterschiede in der Präsentation von MHC-Klasse II restringierten Antigenen an  $CD4^+$  T-Zellen festgestellt werden. Auch in zwei weiteren vergleichbaren Versuchen gab es keine signifikanten Unterschiede in der  $CD4^+$  T-Zell Antwort.



**Abbildung. 5.17: *In vivo* OT-II Expansion nach einer Immunisierung mit OVA oder OVA<sub>323-339</sub> und LPS.**  $4 \times 10^6$  OT-II Zellen wurden adoptiv transferiert. Immunisiert wurde mit 100  $\mu$ g OVA bzw. 10  $\mu$ g OVA<sub>323-339</sub> und 10  $\mu$ g LPS. Im Diagramm sind OT-II Zellen der Milz an Tag drei nach Immunisierung dargestellt. Sortiert (*gating*) wurden zunächst  $CD4^+$  Milzzellen, von denen hier alle  $\alpha\alpha 2^+/\alpha\beta 5^+$  Zellen (OT-II von  $CD4$ ) dargestellt werden. Die Ergebnisse von jeweils drei bis fünf Mäusen aus drei vergleichbaren Versuchen sind hier repräsentativ zu sehen. Kontrollwerte wurden von Mäusen ermittelt, die zuvor nur mit LPS, nicht jedoch mit Protein oder Peptid behandelt wurden. NTL:  $CD11c$ - $Rac1(N17)$ -transgennegative Mäuse; Tg<sup>+</sup>:  $CD11c$ - $Rac1(N17)$ -transgene Mäuse.

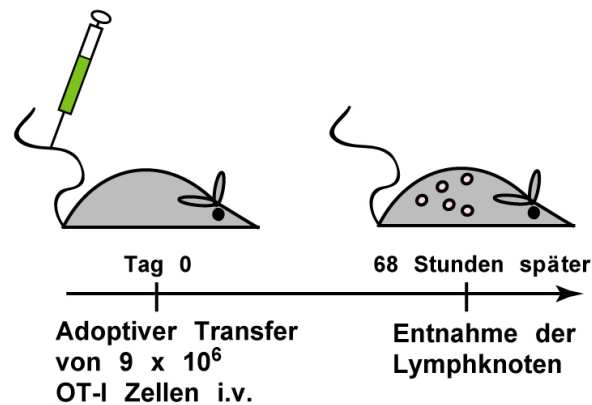
## 5.2 Rac1 defiziente CD8<sup>+</sup> DC in der Toleranzinduktion von zytotoxischen T-Lymphozyten

Im *steady-state* findet ein kontinuierlicher Transfer von gewebspezifischen Ag zu den nahe gelegenen Lymphknoten statt (Kurts et al., 1997; Redmond and Sherman, 2005). Wenn Modell-Gewebsantigene in ausreichenden Mengen in peripheren Geweben exprimiert werden, werden sie kontinuierlich CD8<sup>+</sup> T-Zellen kreuzpräsentiert. Nach vorübergehender Proliferation dieser T-Zellen folgt deren spezifische Deletion, ein Mechanismus der peripheren Toleranzausübung.

Um herauszufinden, ob CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> Mäuse einen Defekt in der kontinuierlichen Ausübung peripherer Toleranz haben, wurden CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> Mäuse in den Rip-mOVA Hintergrund gezüchtet, um Rac/Rip doppeltransgene Mäuse zu generieren. Der Ratten-Insulin-Promotor kontrolliert in Rip-mOVA Mäusen die Expression des membrangebundenen Ovalbumins und ist spezifisch im Pankreas, den Nieren und im Thymus nachweisbar (Gallegos and Bevan, 2004; Kurts et al., 1996). mOVA wird in diesen Mäusen regelmäßig als Gewebsantigen phagozytiert und kreuzpräsentiert. Die CD8 T-Zell-Toleranz funktioniert in diesen Mäusen sehr effizient, da OVA spezifische T-Zellen nach Immunisierung nicht nachweisbar waren (Gallegos and Bevan, 2006). Für die Toleranzinduktion in adoptiv transferierten OVA-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch Deletion war in diesem Mausmodell zunächst die Kreuzpräsentation von OVA und anschließende T-Zell Proliferation nötig (Kurts et al., 1996; Kurts et al., 1998a; Kurts et al., 1997).

### 5.2.1 Reduzierte *in vivo* Proliferation autoreaktiver CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Rac/Rip Mäusen

Um die Proliferation OVA-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen genauer zu untersuchen, wurden OT-I Zellen vor dem adoptiven Transfer in CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> oder Rac/Rip Rezipienten mit CFSE markiert (siehe 4.2.2.13). Es folgte keine Immunisierung, damit das Verhalten von OT-I Zellen in doppeltransgenen Mäusen auf die Entstehung von peripherer Toleranz hin untersucht werden konnte (siehe experimenteller Ablauf Abb. 5.18). Da auch bei Tolerisierung zunächst eine spezifische Proliferation stattfindet, wurde erwartet, dass transferierte OT-I Zellen in Rip-mOVA Mäusen proliferieren, um schließlich eliminiert zu werden. In doppeltransgenen Mäusen wäre es möglich, dass aufgrund der defekten Kreuzpräsentation weniger OT-I Zellen proliferieren. Möglicherweise könnten die transferier-

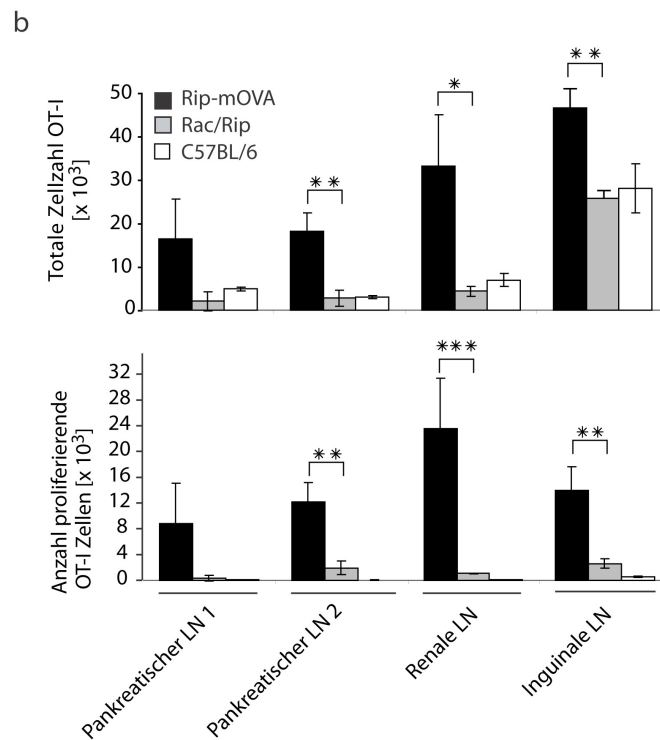
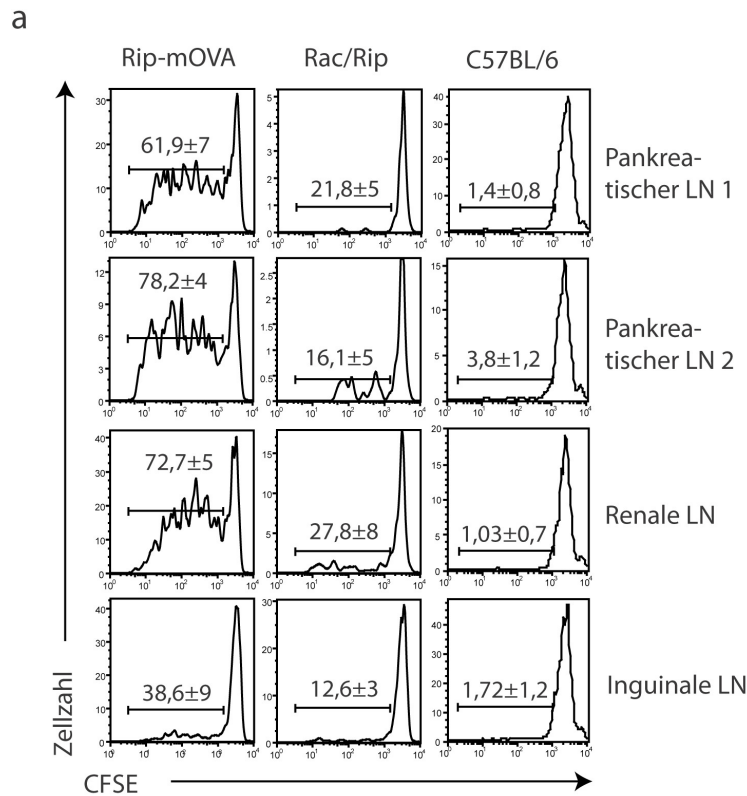


**Abbildung. 5.18: Schematische Darstellung der Analyse einer *in vivo* Proliferation von OVA-spezifischen T-Zellen in pankreatischen Lymphknoten von Rac/Rip Mäusen.** Unbestrahlte CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> x Rip-mOVA (Rac/Rip) Mäuse erhielten i.v. je  $9 \times 10^6$  CFSE-markierte OT-I Zellen in Ly5.1 Hintergrund (Tag 0). Die Lymphknoten wurden 68 Stunden später entnommen und analysiert.

ten T-Zellen dann aber aktivierbar sein, wenn die Kreuztoleranz in Rac/Rip Mäusen schlechter funktioniert.

Die Markierung der transferierten OT-I Zellen mit CFSE ermöglichte die detaillierte Quantifizierung der OT-I Expansion auf Zellteilungsebene. 68 Stunden nach dem Transfer von  $9 \times 10^6$  CFSE markierten OT-I Zellen wurden die drainierenden pankreatischen Lymphknoten einzeln untersucht, von denen es zwei gibt (LN 1 und LN 2), sowie die renalen Lymphknoten. Zudem wurden die nicht drainierenden inguinalen Lymphknoten als Kontrolle untersucht. Als Kontrolle diente außerdem eine C57BL/6 Maus, in der das Modell-Gewebsantigen OVA nicht exprimiert wird. Hier wurde ebenfalls erwartet, dass transferierte OT-I Zellen nicht proliferieren. Jede Teilung der OT-I Zellen resultiert in einer Abnahme der CFSE-Konzentration in der Mutterzelle, da bei jeder Teilung 50% des fluoreszierenden Farbstoffs an die Tochterzelle weitergegeben wird. Diese Abnahme der Fluoreszenz pro Zellteilung äußert sich bei der FACS-Analyse in unterschiedlichen Messspitzen verminderter Fluoreszenz, so genannte „Peaks“. Die Analyse dieser Peaks ermöglicht eine genaue quantitative Berechnung der Zellteilungsrate.





**Abbildung 5.19: Proliferation OVA-spezifischer T-Zellen in pankreatischen Lymphknoten von Rac/Rip Mäusen.** CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> x Rip-mOVA (Rac/Rip) Mäuse erhielten i.v. je  $9 \times 10^6$  CFSE-markierte OT-I Zellen in Ly5.1. Lymphknoten wurden 68 Stunden später analysiert. In den Histogrammen (**a**) sind ungeteilte Zellen (rechter peak) und Tochterzellen mit verdünntem CFSE zu sehen. In **b**) sind totale Zellzahlen (oben) zu sehen sowie die totalen Zahlen der sich geteilten OT-I Zellen (unten). Als Kontrollen dienten CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> Mäuse und C57BL/6 Mäuse, die kein mOVA exprimieren. Die Daten sind repräsentativ für je drei Mäuse in zwei Versuchsdurchgängen. \* = signifikant; \*\* = hoch signifikant; \*\*\* = extrem signifikant, siehe auch 4.3.

Wie der Literatur entsprechend (Kurts et al., 1996; Kurts et al., 1998a; Kurts et al., 1997; Redmond and Sherman, 2005) zu erwarten, wurde nach 68 Stunden eine deutliche Proliferation von transferierten OT-I Zellen in drainierenden Lymphknoten (pankreatische und renale LN) der Rip-mOVA Maus gefunden (Abb. 5.19, linke Spalte). In Kontroll-Lymphknoten (inguinale LN) wurde eine stark abgeschwächte Proliferation gesehen. Im Kontrast dazu zeigte sich eine stark reduzierte OT-I Proliferation in Rac/Rip und C57BL/6 Rezipienten (Abb. 5.19, mittlere und rechte Spalte). Der Anteil der sich teilenden Zellen (siehe *gate* in den Histogrammen Abb. 5.19 a) war in doppeltransgenen Mäusen teils hoch signifikant um das Drei- bis Vierfache reduziert. Als eine Konsequenz daraus waren auch die totalen Zellzahlen der OT-I Zellen und die totale Anzahl der proliferierenden OT-I Zellen in doppeltransgenen Mäusen teils hoch signifikant reduziert (Abb. 5.19 b). Diese Daten sprechen dafür, dass eine defekte Kreuzpräsentation durch DC zu einer signifikanten Unfähigkeit der DC führt, Gewebsantigene zu präsentieren und eine Proliferation selbstreaktiver CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu induzieren.

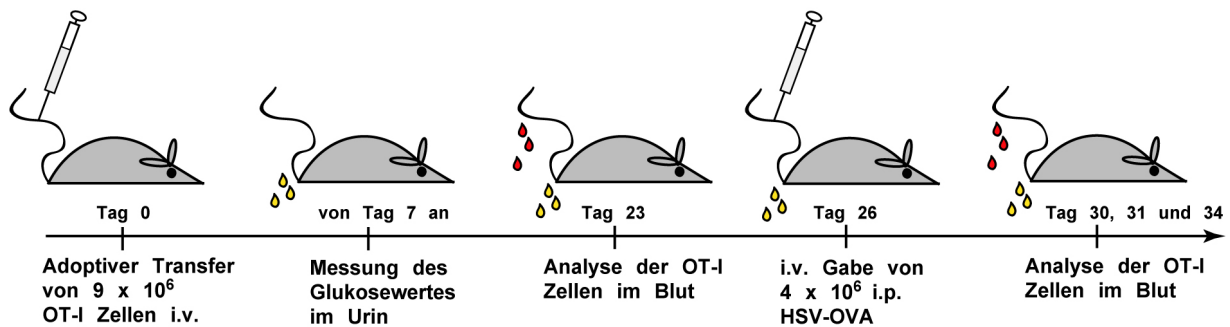
### 5.2.2 Reduzierte periphere Toleranzinduktion in Rac/Rip Mäusen

Es wurde bereits in der Einleitung beschrieben, dass die Proliferation autoreaktiver CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Abwesenheit inflammatorischer Stimuli zur darauf folgenden Deletion dieser T-Zell Population und damit zur peripheren Toleranz führt. Im nächsten Experiment wurde untersucht, ob die beobachtete Unfähigkeit der transgenen DC zur Kreuzpräsentation von Selbstantigenen und effizienten Induktion einer T-Zell Proliferation die Ausübung peripherer Toleranz hemmen würde. Abb. 5.20 verdeutlicht den experimentellen Versuchsablauf.

Bis zu drei Wochen nach einem adoptiven Transfer von OT-I Zellen wurden Glukosewerte im Urin der Rezipienten mit Glukosestreifen (Roche Diagnostics, Meylan, France) ermittelt, um ein eventuelles Auftreten von Diabetes zu detektieren. Ab einem Glukosewert von 200 mg/dL im Urin wird ein Versuchstier für diabetisch erklärt (Hugues et al., 2002). Die Versuchstiere wurden dann mit HSV-OVA immunisiert, um die transferierten T-Zellen auf Entstehung von Toleranz bzw. Anergie zu testen. Dazu wurden die Glukosewerte im Urin und OT-I Zellen im Blut weiter analysiert.

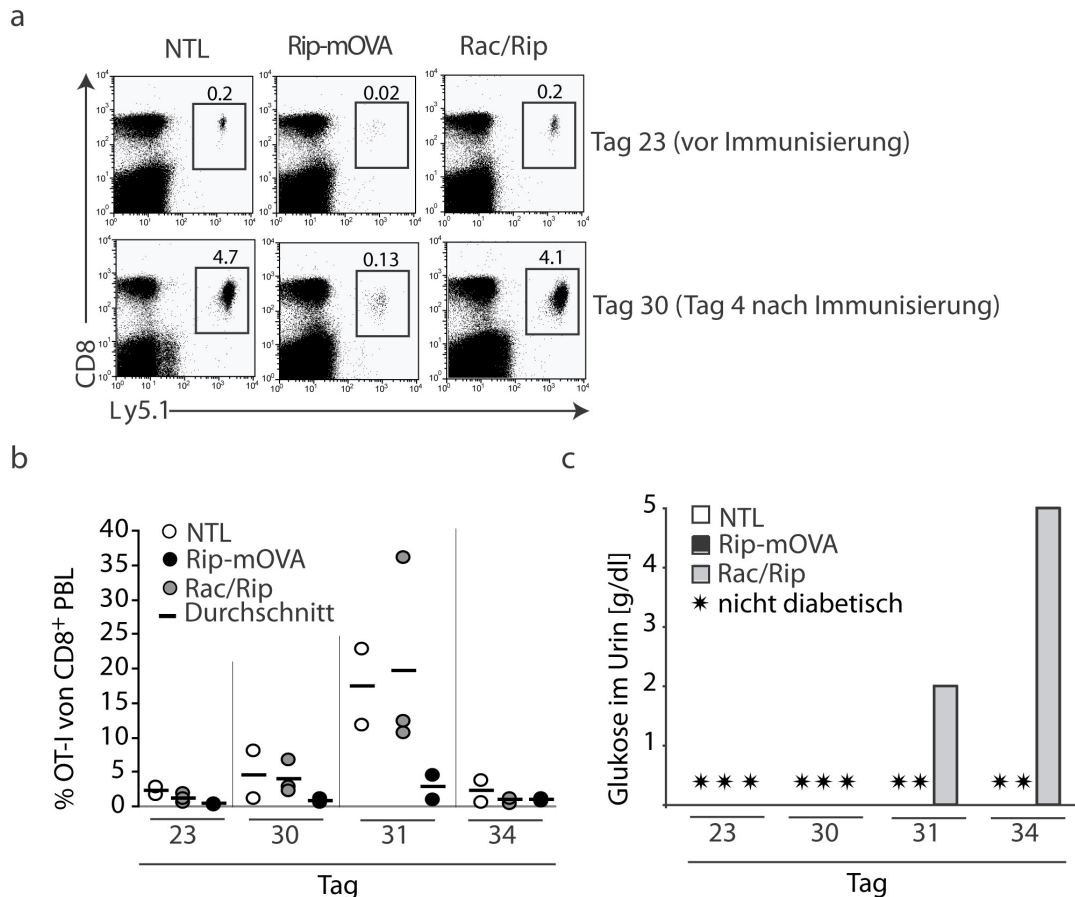
💧 Urinentnahme zur Bestimmung des Glukosewertes

🩸 Blutentnahme zur Bestimmung der OT-I Frequenz



**Abbildung. 5.20: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs.** Unbestrahlte CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> x Rip-mOVA (Rac/Rip) und CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> Mäuse erhielten i.v. je  $9 \times 10^6$  OT-I Zellen in Ly5.1 Hintergrund (Tag 0). Der Glukosewert im Urin wurde daraufhin regelmäßig gemessen. An Tag 23 wurde venöses Blut entnommen, deren OT-I Anteil analysiert wurde. 24 Stunden später (Tag 26) wurden die Mäuse i.v. mit  $4 \times 10^6$  infektiösen Partikeln (i.p.) HSV-OVA infiziert, woraufhin das Blut der Mäuse einige Tage später auf OT-I Proliferation hin untersucht wurde (Tag 30, 31 und 34).

Bis zu dem Zeitpunkt vor der Immunisierung mit HSV-OVA (Tag 26) wurde weder in Rip-mOVA noch in Rac/Rip Mäusen Diabetes festgestellt (Abb. 5.21 c). Verglichen mit Rip-mOVA Rezipienten zeigte die Analyse der transferierten OT-I Zellen vor HSV-OVA Immunisierung (Tag 23) in Mäusen, die kein OVA exprimieren (NTL) eine etwa zehnfache Frequenz von OT-I Zellen im Blut auf (Abb. 5.21 a). Trotz OVA-Expression in Rac/Rip Mäusen war die Frequenz der OT-I Zellen hier jedoch nicht vermindert sondern, ganz im Gegenteil, vergleichbar mit den OT-I Frequenzen in NTL. Wie erwartet waren die OT-I Zellen in Rip-mOVA Mäusen tolerant, was die gemessenen OT-I Frequenzen vier Tage nach HSV-OVA Immunisierung (Tag 30) verdeutlichen. Es gab in diesem Fall kaum eine Expansion. Dahingegen konnte eine etwa zwanzigfache Expansion der OT-I Zellen in doppeltransgenen Mäusen und NTL verzeichnet werden. Diese Daten argumentieren dafür, dass das (N17)Rac1 Transgen in DC die Kreuzpräsentation und damit auch die Ag-spezifische Toleranzinduktion verhindert auch wenn peripheres Ag vorhanden ist.



**Abbildung. 5.21: Periphere *in vivo* Toleranzinduktion in Rac/Rip Mäusen.** Unbestrahlte Rip-mOVA-, CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> x Rip-mOVA (**Rac/Rip-**) und CD11c-Rac1(N17)-transgennegative (NTL-) Mäuse erhielten jeweils  $9 \times 10^6$  Ly5.1<sup>+</sup> OT-I Zellen i.v. 23 Tage später wurden die Frequenzen der OT-I Zellen von CD8<sup>+</sup> im Blut analysiert, das der Vene entnommen wurde (a, obere Reihe und b). An Tag 26 wurde mit HSV-OVA i.v. immunisiert. Veränderungen der OT-I Frequenzen an Tag 4, 5 und 8 nach Immunisierung sind dargestellt (a, untere Reihe und b). Das Aufkommen von Diabetes ist in c) dargestellt. Die genauen Glukosewerte werden in Abb. 5.22 gezeigt. Es wurden drei Mäuse pro Gruppe verwendet. Der Versuch wurde zweimal mit entsprechenden Ergebnissen durchgeführt.

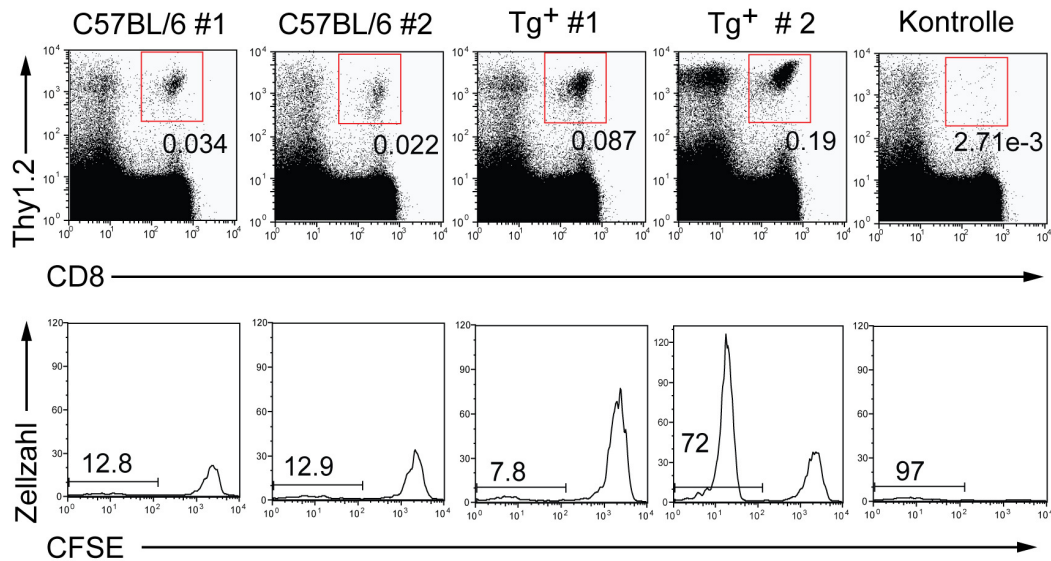
Um die Abwesenheit von Kreuztoleranz in diesen Mäusen funktionell zu beweisen, wurde nach der HSV-OVA Immunisierung das Aufkommen von Diabetes getestet. Abb. 5.21 c) zeigt die Glukosewerte im Urin der Versuchstiere an den verschiedenen Zeitpunkten. Wie erwartet entwickelten NTL kein Diabetes, da sie kein OVA in den  $\beta$ -Inselzellen exprimieren. Rip-mOVA Mäuse entwickelten kein Diabetes, da deren OT-I Zellen, wie in Abb. 5.21 a) und b) gezeigt wurde, tolerant waren. An ihnen wurde „Kreuztoleranz“ induziert. Dahingegen entwickelten alle Rac/Rip Mäuse starkes Diabetes ab Tag fünf (Tag 31) nach HSV-OVA Immunisierung. Das bestätigt deutlich die Abwesenheit einer schützenden Kreuztoleranz.

### 5.2.3 Erhöhte Anzahl potentiell autoreaktiver CD8<sup>+</sup> T-Zellen in CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> Mäusen

Das Repertoire der T-Zellen wird im Thymus durch Kontakte mit Selbstpeptiden und MHC-Molekülen gebildet (Bevan, 1977; Jameson et al., 1995; Kappler et al., 1987a; Sprent et al., 1988; von Boehmer, 1990), die von DC und vermutlich TECs präsentiert werden. Fraglich war, ob die Unfähigkeit der DC zur Kreuzpräsentation in transgenen Mäusen nicht auch die Ausübung der zentralen Toleranz beeinträchtigt. In unserem Labor wurde jedoch ausgeschlossen, dass Rac die zentrale Toleranz beeinträchtigt (siehe Diskussion). Nichts desto trotz wäre es möglich, dass T-Zellen mit geringer Affinität gegen Selbstantigene in die Peripherie gelangen. Im Normalfall könnten diese T-Zellen durch kreuzpräsentierende DC tolerisiert werden. Wie bereits oben gezeigt wurde, ist die Induktion von Kreuztoleranz in CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> Mäusen jedoch inhibiert. Die tatsächliche Präsenz von potentiell selbstreaktiven, nicht tolerisierten T-Zellen in transgenen Mäusen soll im nächsten Schritt nachgewiesen werden. Das kann in der Weise geschehen, dass eben diese T-Zellen mit CFSE markiert werden und adoptiv in syngene Wildtyp-Rezipienten transferiert werden, die normal kreuzpräsentierende DC aufweisen. Tatsächlich selbstreaktive transferierte T-Zellen könnten dann aufgrund einer CFSE-Verdünnung identifiziert werden, was auf eine spezifische Proliferation schließen lässt. Zur Durchführung dieses Versuchs wurden  $10 \times 10^6$  T-Zellen von transgenen Mäusen, die automatisch den Marker Thy1.2<sup>+</sup> aufweisen, mit einem *Pan-T Cell Isolation Kit* (siehe 4.2.2.5) isoliert und vor einem Transfer in C57BL/6 Thy1.1<sup>+</sup> Rezipienten mit CFSE (4.2.2.13) markiert. Fünfzehn Tage später wurden die Milzen der Rezipienten entnommen und Milzzellen mit  $\alpha$ CD8 und  $\alpha$ Thy1.2 gefärbt, um durchflusszytometrisch analysiert zu werden. Zum Vergleich wurden C57BL/6-Thy1.1<sup>+</sup> Rezipienten verwendet, die C57BL/6 T-Zellen (Thy1.2<sup>+</sup>) erhielten.

Wie in Abb. 5.22 zu sehen ist, wurde eine Zellteilung in C57BL/6 Thy1.1 Rezipienten nur in einer von 2 Mäusen gesehen, die T-Zellen aus transgenen Mäusen erhielten. In einem weiteren vergleichbaren Versuch, der hier nicht mehr aufgeführt ist, wurde eine Proliferation in drei von vier Mäusen gesehen. In keiner der Rezipienten, die T-Zellen aus C57BL/6 Mäusen erhielten, wurde Proliferation gesehen. Es wurde auch keine Proliferation an Tag 9 oder 5 nach Zelltransfer gesehen (Daten nicht aufgeführt).

Die Unfähigkeit zur Kreuzpräsentation von Selbstantigenen durch transgene DC führte damit zumindest in einigen Fällen zum Nachweis potentiell selbstreaktiver CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Peripherie. Diese T-Zellen konnten durch die Präsentation spezifischer Antigene von intakten DC in Wildtypmäusen proliferieren.



**Abbildung. 5.22: Proliferation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> Mäusen in C57BL/6 Thy1.1 Rezipienten.** Jeweils  $9 \times 10^6$  aufgereinigte T-Zellen aus CD11c-Rac1(N17)-Donoren (Thy1.2<sup>+</sup>) (= Tg<sup>+</sup> #1 und #2) sowie aus C57BL/6-Donoren (Thy1.2<sup>+</sup>) (= C57BL/6 #1 und #2) wurden i.v. in unbestrahlte C57BL/6 Thy1.1<sup>+</sup> Rezipienten transferiert. 15 Tage später wurden die Milzen der Rezipienten entnommen und durchflusszytometrisch analysiert. Das Fenster in rot zeigt alle transferierten T-Zellen der Milzzell-Population. Eine eventuelle T-Zell Proliferation kann anhand der CFSE-Verdünnung (untere Reihe) festgestellt werden. Die gates im Histogramm umfassen alle transferierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die in den Rezipienten proliferierten. Als Kontrolle diente ein C57BL/6 Thy1.1 Rezipient, der kein Transplantat erhielt.

## 5.2.4 Funktionaler Autoimmunitätstest in Chimären

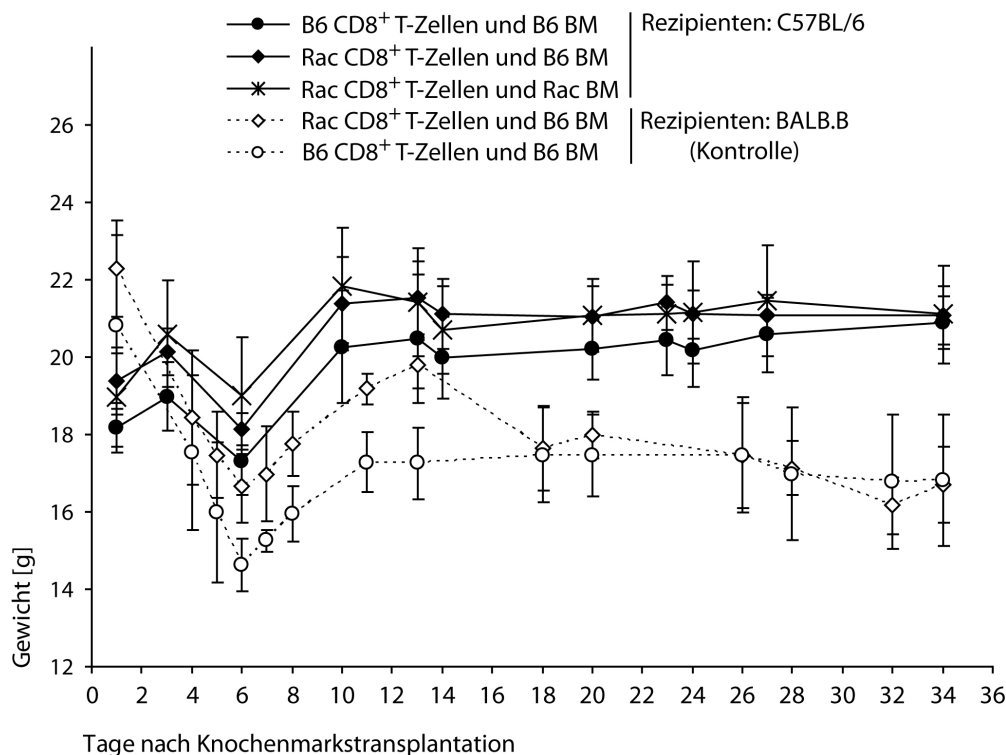
Nachdem nun in der Peripherie von einigen CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> Mäusen die Präsenz von potentiell selbstreaktiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen gezeigt wurde, ist anschließend untersucht worden, ob diese CTL in Mäusen mit nicht-transgenen DC funktionell sind. Die Selbstantigene, die CD8<sup>+</sup> T-Zellen in transgenen Mäusen wahrscheinlich nie „gesehen“ haben, da DC sie schlechter kreuzpräsentieren konnten, könnten in syngenem Wildtypempfängern zur Aktivierung der selben T-Zellen führen, da die Kreuzpräsentation hier normal funktioniert. Dies könnte sich in CTL-Effektorfunktionen bemerkbar machen, die gegen verschiedene eigene Gewebe im Empfänger gerichtet sind. Äußern könnten sich die Effektorfunktionen, in diesem Fall Autoimmunreaktionen, mit den typischen Symptomen der Transplantat-gegen-Empfänger Krankheit (engl.: *graft-versus-host disease*, GVHD). CTL können, nun aktiviert, in die peripheren Gewebe einwandern, wobei insbesondere ein *homing* in Darm, Leber, Lunge und Haut beobachtet wird (Korngold R and Sprent J; ED Thomas Blume, Hematopoietic cell transplantation. 2nd ed. Blackwell 1999). Treffen z.B. CD8<sup>+</sup> T-Zellen in

diesen Geweben erneut auf ihr Ag, können Zielzellen direkt durch sie zerstört werden. Daneben sind aber auch andere Effektorfunktionen bekannt. Um solch ein Phänomen zeigen zu können, müssen zuvor alle T- und B-Zellen der Empfänger zerstört werden, damit das Transplantat (die zu transferierenden T-Zellen der transgenen Mäuse) möglichst nicht vom Empfänger abgestoßen wird (Empfänger gegen Transplantat Reaktion, engl.: *host-versus-graft reaction*, HVGR). Es wurden daher C57BL/6 Mäuse (Empfänger) mit 950 Rad bestrahlt. Sechs Stunden danach wurde den Mäusen i.v. ein Gemisch aus je  $4 \times 10^6$  Knochenmarkszellen und je  $2 \times 10^6$  isolierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus peripheren lymphatischen Geweben transferiert (siehe Tab. 5.1 und Methode 4.2.2.18). Bestimmte Symptome, wie Gewichtsverlust, geringe Aktivität, Kyphose (Buckelausbildung), abstehendes Fell und schuppige Haut werden für die GVHD beschrieben (Cooke et al., 1996). Die Empfängertiere wurden daher für fünf Wochen gewogen (siehe Abb. 5.22) und beobachtet. Als Kontrollmäuse wurden für diesen Versuch BALB.B Mäuse verwendet, die im Vergleich zu C57BL/6 Mäusen syngen sind, sich aber in 29 Nebenhistokompatibilitäts-Antigenen (engl.: *minor histocompatibility antigens* (mHAgs) von ihnen unterscheiden. Das Ausmaß einer GVHD sollte hier augenscheinlich werden und zum Vergleich dienen, da mehr als drei Unterschiede in den mHAgs laut Literatur ausreichend für die Entstehung einer GVHD sind. Die Kontrollmäuse sollte schließlich im Laufe von vier Wochen sterben (Korngold, R and Sprent, J, 1999, (Kappel et al., 2006).

| <i>Rezipient</i> | <i>Donor CD8<sup>+</sup> T-Zellen<br/>(<math>2 \times 10^4</math>)</i> | <i>Donor Knochenmark<br/>(<math>4 \times 10^6</math>)</i> | <i>GVHD erwartet</i> |
|------------------|--|---|----------------------|
| <b>C57BL/6</b>   | C57BL/6  | C57BL/6   | -                    |
| <b>C57BL/6</b>   | Tg <sup>+</sup>  | C57BL/6   | ?                    |
| <b>C57BL/6</b>   | Tg <sup>+</sup>  | Tg <sup>+</sup>   | ?                    |
| <b>BALB.B</b>    | C57BL/6  | C57BL/6   | +                    |
| <b>BALB.B</b>    | Tg <sup>+</sup>  | Tg <sup>+</sup>   | +                    |

**Tabelle. 5.1: Versuchsaufbau.** Die Chimären wurden wie in der Tabelle dargestellt gebildet. Sechs Stunden vor der Injektion des Gemisches aus CD8<sup>+</sup> T-Zellen und Knochenmarkszellen wurden die Rezipienten mit 950 Rad bestrahlt. Für die folgenden Wochen wurde den Mäusen kein Neomycinwasser gegeben. Tg<sup>+</sup>: CD11c-Rac1(N17) -transgene Mäuse.

Das Ergebnis dieses funktionellen *in vivo* Tests ist in der Abb. 5.24 dargestellt. Nach einer anfänglichen Schockphase (bis Tag sechs), in der alle C57BL/6 Rezipienten etwa ein zehntel ihres Ausgangsgewichts verloren haben, erholten sie sich auch wieder und haben bis zum Ende des gemessenen Zeitraumes nicht mehr an Gewicht verloren. Es wurden keinerlei GVHD-Symptome an ihnen gesichtet. Erstaunlicherweise verloren auch die Kontrollmäuse nicht wesentlich an Gewicht nachdem sie sich erholt haben. Dabei verloren sie allerdings in der Anfangsphase mit ein viertel bis ein drittel des Ausgangswertes mehr Gewicht als die C57BL/6 Mäuse. In der Anfangsphase wurden abstehendes Fell und geringe Aktivität beobachtet, die Mäuse sahen ab Tag 10 aber wieder gesund aus. Keine der Mäuse ist bis zum Ende des Versuchszeitraumes gestorben.



**Abbildung. 5.24: Funktionaler Autoimmunitätstest in Chimären.** C57BL/6- (B6) Rezipienten wurden 4 h vor Transplantation mit 950 Rad bestrahlt.  $2 \times 10^6$  CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus B6- bzw. CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> - (Rac) Mäusen wurden mit jeweils  $4 \times 10^6$  Knochenmarkszellen aus B6- bzw. Rac- Mäusen in die bestrahlten Rezipienten transplantiert. Als Kontrolle dienten BALB.B Rezipienten, die genauso behandelt wurden wie die B6-Rezipienten. Das Gewicht der Chimären wurde regelmäßig untersucht. Der Versuch wurde einmal mit fünf Mäusen pro Gruppe durchgeführt.



Es wird tatsächlich in der Literatur diskutiert, dass  $CD8^+$  T-Zellen nicht zwingend auf die Hilfe von  $CD4^+$  T-Zellen angewiesen sind, um eine GVHD gegen mHAg auszulösen, jedoch trifft das nicht für alle Kombinationen von Mauslinien zu. Je nach Art der mHAg in den Mauslinien könnten unterschiedliche  $CD4^+$  T-Zell Gruppen ( $T_{h1}$  oder  $T_{h2}$ ) stimuliert werden. Für BALB.B Mäuse wurde in der Tat beschrieben, dass potentiell autoreaktive  $CD8^+$  T-Zellen ohne  $CD4^+$  T-Zell Hilfe keine Autoimmunität auslösen (Korngold and Sprent, 1987). Dieser abschließende Versuch, der diese Erkenntnis noch nicht berücksichtigt hatte, soll aber hier dennoch dazu dienen, die Rolle der  $CD4^+$  T-Zellen in diesem System noch einmal zu verdeutlichen. Im Anschluss an diese Doktorarbeit sollten die bearbeiteten Fragestellungen unter Berücksichtigung der  $CD4^+$  T-Zell Hilfe weitergeführt werden. Es ist nicht auszuschließen, dass das *cross-priming* von  $CD8^+$  T-Zellen durch  $CD8^+$  DC *in vivo* generell abhängig ist von der  $CD4^+$  T-Zell Hilfe.

## 6 DISKUSSION

Es gibt zurzeit mehr als 80 klinisch verschiedene und weit verbreitete Autoimmunkrankheiten, zu denen z. B. der Systemische Lupus erythematoses gehören oder die Multiple Sklerose, rheumatoide Arthritis, Psoriasis oder Diabetes mellitus Typ-1. Autoimmunkrankheiten haben miteinander gemein, dass die Kontrolle selbstreaktiver T-Lymphozyten zusammenbricht. Die genauen Ursachen dafür sind bis heute noch nicht vollständig geklärt. Die durch selbstreaktive T-Lymphozyten verursachten Gewebeschäden tragen schließlich zu den verschiedensten Symptomen einer Autoimmunkrankheit bei. 2001 wurde erstmals die Behauptung aufgestellt, dass DC die Hauptrolle darin einnehmen, selbstreaktive T-Zellen im Thymus zu eliminieren, sowie selbstreaktive T-Zellen in der Peripherie zu tolerisieren (Steinman and Nussenzweig, 2002). Bereits 1997 haben Kurts et al. gezeigt, dass die MHC-Klasse I restringierte Kreuzpräsentation von exogenen Selbstantigenen zur Deletion autoreaktiver CD8<sup>+</sup> T-Zellen führt (Kurts et al., 1997). Die Modifizierung der Kreuzpräsentation von Selbstantigenen durch DC könnte demnach ein geeigneter Ansatzpunkt sein, den Verlauf von Autoimmunkrankheiten zu steuern. Auf die Induktion der peripheren Toleranz durch kreuzpräsentierende DC sollte dabei ein Hauptaugenmerk gesetzt werden. Bisher liegen keine *in vivo* Studien vor, die die direkte Rolle der Kreuzpräsentation von Selbstantigenen durch DC in der Induktion von CD8<sup>+</sup> T-Zell Toleranz belegen.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig ein Mausmodell verwendet, das für solche *in vivo* Studien zweckmäßig war, da es einen spezifischen Defekt in der Kreuzpräsentation durch C11c<sup>+</sup> DC aufweist. Diese CD11c-Rac1(N17) Mauslinie wurde zunächst daraufhin geprüft, ob sie für *in vivo* Studien über Kreuzpräsentation durch DC in Immunität und Toleranz geeignet ist (diskutiert unter 6.1). Nach Feststellung der Eignung wurde sie mit dem Mausmodell Rip-mOVA gekreuzt, um die direkte Rolle der Kreuzpräsentation des Gewebs-Modell-Antigens OVA auf die Induktion von Toleranz in CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu untersuchen. Die Entwicklung des autoimmunen Diabetes ist die Konsequenz einer progressiven Zerstörung von  $\beta$ -Inselzellen durch von T-Lymphozyten angetriebene Mechanismen (Tisch and McDevitt, 1996). Die Manifestierung einer Immunkrankheit war demnach anhand des Glukosewertes im Urin der Versuchstiere überprüfbar, der bei Entstehung eines autoimmunen Diabetes auf mehr als 200 mg/dL (Hugues et al., 2002) ansteigt (diskutiert in 6.2 bis 6.2.2). Durch adoptiven Transfer von T-Zellen der CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> Maus in Wildtyp-Rezipienten wurde die Gegenwart potentiell autoreaktiver CD8<sup>+</sup> T-Zellen *in vivo* analysiert. Dieses Experiment beleuchtet erstmals die direkte Rolle von Kreuzpräsentation in der Kontrolle von selbstreaktiven T-Zellen unter physiologischen Bedingungen (diskutiert in

6.2.3). Die Bedeutung von Toleranzinduktion durch Kreuzpräsentation zur Aufrechterhaltung eines dauerhaften Schutzes gegen Autoimmunreaktionen wurde in Knochenmark-Chimären *in vivo* untersucht (diskutiert in 6.2.4). Wie man sich eventuelle Therapie-Ansätze im Detail vorstellen könnte, wird abschließend in 6.3 diskutiert.

## 6.1 Induktion von CD8<sup>+</sup> T-Zell Immunität durch Rac1 defiziente DC

### 6.1.1 CD8<sup>+</sup> T-Zell Immunität durch Kreuzpräsentation

In CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> Mäusen war die OT-I Expansion nach Immunisierung mit OVA-Protein am Expansionsmaximum etwa um das Dreifache reduziert (Abb. 5.2 c). Die OT-I Zellen in diesen Mäusen waren zudem weniger aktiviert. Die totale Zellzahl in transgenen Mäusen war gegenüber NTL um das 3,5-fache reduziert (Abb. 5.3). Die Analyse der totalen Zellzahlen geht damit konform mit den prozentualen Angaben. Auch die IFN- $\gamma$  Produktion war in transgenen Mäusen um ca. ein Drittel reduziert (Abb. 5.4). Weiterhin war die spezifische Lyse in CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> Mäusen im Vergleich zu NTL-Rezipienten 7 h nach Zelltransfer zwei- bis dreifach weniger effizient (Abb. 5.5).

Diese Ergebnisse gehen konform mit denen, die mit zellassoziiertem OVA beobachtet wurden (Kerksiek et al., 2005). Bestrahlte MHC-Klasse I defiziente Milzzellen wurden mit OVA beladen und nach einem OT-I Zell Transfer in CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> Mäuse injiziert. Auch hier war die Anzahl der expandierten OT-I Zellen auf das Dreifache reduziert. Eine sogar fünffache Reduktion in der Expansion SIINFEKL-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurde *in vivo* von derselben Arbeitsgruppe beobachtet, nachdem mit dem rekombinanten OVA-exprimierenden Pathogen *Listeria monocytogenes* stimuliert wurde. Eine Übereinstimmung wurde auch in der IFN- $\gamma$  Produktion und den vorhandenen spezifischen Zellzahlen gefunden. Kerksiek et al. beobachteten eine signifikante Reduktion der Aufnahme von OVA-FITC durch CD8<sup>+</sup> DC in transgenen Mäusen *in vivo*. Eine reduzierte *in vivo* Aufnahme von DQ-OVA in transgenen Tieren wurde hier sechs Stunden nach Injektion nicht beobachtet. In anbetracht der schnellen Aufnahme von DQ-OVA durch DC innerhalb von Minuten (z.B. (Miller et al., 2003) muss in Betracht gezogen werden, dass es in dem hier durchgeführten Experiment nach sechs Stunden eventuell zu einer Akkumulation von DQ-OVA im Zytoplasma kam. Das könnte erklären, dass eine reduzierte Ag-Aufnahme nicht mehr nachweisbar war. Um diesen Punkt abzuklären, sollte vom Nachfolger dieses Projektes eine DQ-OVA Aufnahme *in vivo* zu einem kürzeren Zeitpunkt nach Injektion untersucht werden, z.B. nach 30 min. Die Ergebnisse von Kerksiek et al. und der hier gesehene Defekt der *in*

*vitro* Aufnahme von OVA-Alexa-Fluor durch Rac1 defiziente CD8<sup>+</sup> DC belegen insgesamt eine reduzierte Ag-Aufnahme.

Da kein signifikanter Unterschied in der CD4<sup>+</sup> T-Zell Immunität (Abb. 5.17) beobachtet wurde, könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass die verminderte Fähigkeit zum *cross-primen* von CD8<sup>+</sup> T-Zellen in CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> Mäusen nicht nur auf einer reduzierten Antigenaufnahme basiert. Die verschiedenen in der Einleitung besprochenen Möglichkeiten, wie exogenes Ag Zugang in das Zytosol von DC bekommen, machen deutlich, dass die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts auch intrazellulär von Bedeutung ist. Es ist demnach nicht auszuschließen, dass Rac1-defiziente DC auch einen Defekt in der Ag-Beladungsmaschinerie haben.

Zusammenfassend lässt sich daher sagen, dass die Kreuzpräsentation von antigenen Epitopen, die von löslichen OVA-Proteinen stammen, in CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> Mäusen *in vivo* stark inhibiert ist, was zumindest zum Teil auf einer verminderten Fähigkeit der Ag-Aufnahme beruht.

Es wurde bereits mehrfach in der Literatur beschrieben, dass die MHC-Klasse I restringierte Präsentation von Ag, die durch Makropinozytose aufgenommen wurden, sehr ineffizient kreuzpräsentiert werden und dazu relativ hohe Ag-Mengen notwendig sind (siehe Abschnitt 5.1.4). Immunkomplexe (IC) und Ag, die an Partikel adsorbiert werden, können die Ag-Präsentation enorm verbessern. Im Gegensatz zu LPS aktivieren Immunkomplexe DC über Fc-Rezeptoren, die gebunden und kreuzvernetzt werden. Eine daraus resultierende vermehrte pMHC-Präsentation ist zumindest partiell in Zusammenhang zu bringen mit der effizienteren Aufnahme von IC, denn eine durch IC stimulierte Aktivierung von DC an sich war nicht ausreichend für eine vermehrte pMHC-Präsentation (Schuurhuis et al., 2002). Das passt auch zu der Beobachtung, die im Rahmen dieser Arbeit gemacht wurde, nämlich dass Rac1 defiziente DC wesentlich schlechter CTLs aktivieren konnten. Das spricht dafür, dass Rac1 defiziente DC auch IC wesentlich weniger effizient aufnehmen als Wildtyp-DC. Die CD8<sup>+</sup> T-Zell Aktivierung durch Ag, die in Form von IC vermittelt wurden, scheint unabhängig von CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu sein (siehe hierzu Schuurhuis et al., 2002).

Die im Rahmen dieser Arbeit gemachten Beobachtungen sind vergleichbar mit denen von Schuurhuis et al. Auch hier wurde ermittelt, dass ein Minimum von 100 µg OVA nötig ist, um Kreuzpräsentation *in vivo* zu messen, wohingegen nur 1 µg OVA in Form von Immunkomplexen nötig war. Zusätzlich wurde gezeigt, dass ein Defekt in der Rho GTPase Rac1 in DC zu einer dramatischen Einschränkung der Fähigkeit zur Kreuzpräsentation von Ag führt, die über rezeptorvermittelte Endozytose internalisiert werden. Daraus resultierte ebenso eine verminderte zytotoxische Aktivität der OVA-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen.

Der Einsatz von Mikropartikeln als Lieferant für Antigene findet großes Interesse in der Pharmaforschung, da Ag-Partikel-Komplexe stabil sind und eine kontrollierte Abgabe eines Stoffes ermöglichen. Mikropartikel fördern außerdem die Wirkung der an sie adsorbierten Ag, ohne dass der Einsatz von unerwünschten Adjuvantien nötig ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurden OVA-Partikel verwendet, um die Auswirkung der Rac1 Mutation in DC auf Phagozytose zu untersuchen. Es wurde herausgearbeitet, dass auch die Fähigkeit der CD8<sup>+</sup> T-Zell Aktivierung nach Präsentation phagozytierter Ag geschwächt war (5.1.5).

Insgesamt gesehen war die Induktion von Immunität gegen lösliche exogene Antigene durch Rac1 defiziente DC stark abgeschwächt. Die geschwächte Fähigkeit der Rac1 defizienten DC, CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch Kreuzpräsentation zu aktivieren, war unabhängig von der Art der Ag-Aufnahme.

### **6.1.2 CD8<sup>+</sup> T-Zell Immunität durch direkte Ag-Präsentation**

Benvenuti et al. haben gezeigt, dass DC von Mäusen mit einem Doppel-Knockout von Rac1 und Rac2 einen generellen Defekt in der Aktivierung von T-Zellen haben (Benvenuti et al., 2004). Effekte, ausgelöst durch einen einfachen Knockout von Rac1, wurden nicht beschrieben. Es war daher nicht auszuschließen, dass DC von CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> Mäusen einen generellen Defekt in der Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen und nicht nur einen Defekt in der Kreuzpräsentation aufweisen. Um das auszuschließen, wurde in der vorliegenden Arbeit die direkte Präsentation von exogenen und endogenen Antigenen an CTL untersucht. Es zeigte sich, dass die antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen genauso stark durch exogenes OVA<sub>257-264</sub> (SIINFEKL) aktiviert wurden, wie in Wildtypmäusen. Weder in der Expansion, Zellzahl, Aktivierung, IFN- $\gamma$  Produktion noch in der zytotoxischen Effektivität (Abb. 5.6 sowie Daten nicht gezeigt) zeigten sich Abweichungen im Vergleich zu nichttransgenen Mäusen.

Neben der direkten Präsentation von exogenen OVA-Peptiden war auch die Präsentation von viralen Ag (HSV-OVA und MVA-OVA) und die anschließende Aktivierung von spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> Mäusen nicht inhibiert (Abb. 5.7 und 5.8). Es wird daher angenommen, dass beide Virusinfektionen neben allen möglichen anderen Zellen auch DC selbst betreffen. Die jeweiligen Antigene werden dadurch für DC endogen zur Verfügung gestellt und über den direkten Präsentationsweg an CD8<sup>+</sup> T-Zellen präsentiert. Genau diese Vermutung, dass nämlich HSV nicht abhängig ist von Kreuzpräsentation, wird jedoch in der Literatur nicht bestätigt. Ganz im Gegenteil wird von Heath WR und seiner Arbeitsgruppe

behauptet, dass HSV *in vivo* abhängig sei von Kreuzpräsentation (Wilson et al., 2006). Diese These basiert auf Versuchen, in denen Rezipienten systemisch mit dem TLR Liganden CpG behandelt wurden. Die Bindung von CpG verursacht in DC eine Reifung, die charakterisiert ist durch anfängliche Heraufregulation der Phagozytose-Eigenschaften, gefolgt von deren Herabregulierung (Garrett et al., 2000; West et al., 2000; West et al., 2004). Schließlich steigt die Expression von MHC- und kostimulatorischen Molekülen an, die die Aktivierung naiver T-Zellen zulässt und Immunität initiiert (Wilson and Villadangos, 2005). In Mäusen, die jedoch systemisch mit CpG behandelt werden, wird wie z.B. bei einer Malaria-Infektion auch, eine Immunsuppression beobachtet (Cohen, 2002). Worauf diese basiert, ist jedoch weitgehend unbekannt. Möglicherweise basieren diese Beobachtungen auf ähnlichen Mechanismen, die von Redmond diskutiert werden (Redmond and Sherman, 2005), die belegen, dass persistierende Ag Immunität statt Toleranz auslösen.

Wilson NS et al. schlussfolgerten zunächst, dass eine systemische Behandlung mit CpG die Kreuzpräsentation inhibiert, weil OVA-beladene Milzzellen in CpG-behandelten Tieren nicht zu einer *in vivo* OT-I Proliferation führten. Eine Immunisierung CpG-behandelter Mäuse mit HSV neun Stunden später führte *in vivo* nicht zu einer Expansion spezifischer transferierter CD8<sup>+</sup> T-Zellen, was zu dem Schluss führte, dass HSV von Kreuzpräsentation abhängig ist. Ob diese Ergebnisse haltbar sind, ist fraglich. Eine systemische Behandlung mit TLR-Liganden scheint nicht die optimale Methode zu sein, um Kreuzpräsentation zu untersuchen, da damit ein extremer Eingriff in das Immunsystem vorgenommen wird, der unter Umständen nicht nachvollziehbare unerwünschte Wirkungen mit sich bringen kann. Gegen diese Vermutung spricht auch ein *in vitro* Versuch mit HSV-infizierten DC-Subtypen, in dem in derselben Arbeitsgruppe eine intakte HSV-spezifische T-Zell Expansion beobachtet wurde.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Maussystem mit einem ganz spezifischen Defekt in der Kreuzpräsentation von DC verwendet. Zudem wurden endogene HSV-spezifische T-Zellen in einem physiologischen Verhältnis analysiert und nicht, wie im oben angesprochenen Versuch, exogene T-Zellen. Dass im Rahmen dieser Arbeit keine Abhängigkeit des HSV von Kreuzpräsentation beobachtet wurde, scheint demnach vertrauenswürdiger zu sein. Es wird deshalb insgesamt angenommen, dass HSV, wie auch MVA, *in vivo* DC selbst infizieren kann und somit endogen zur Verfügung steht und direkt präsentiert werden kann. Zumindest gilt diese Erkenntnis für die hier verwendete Aufstellung von Versuchsbedingungen, in der ein ausgeprägtes Expansionsverhalten virusspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen dargestellt werden konnte (Abb. 5.7 und 5.8), in transgenen sowie in nicht-transgenen Versuchstieren.

Die hier gesammelten Ergebnisse zur direkten Ag-Präsentation stehen im Kontrast zu den Resultaten, die in 6.1.1 diskutiert werden und auf einer Abhängigkeit von Kreuzpräsentation basieren. Ein genereller Defekt in CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> Mäusen, CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu aktivieren, konnte damit ausgeschlossen werden. Diese Daten bestätigen einen spezifischen Defekt der Kreuzpräsentation in CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> Mäusen, während die direkte Präsentation von Ag normal funktioniert. Damit kann die CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> Maus als ein Modell charakterisiert werden, das hervorragend für die *in vivo* Erforschung der Rolle von Kreuzpräsentation in Immunität und Toleranz geeignet ist.

## 6.2 Die Rolle der Kreuzpräsentation in der Auslösung von Toleranz *in vivo*

Die Kontrolle autoreaktiver T-Zellen in einem Organismus durch Toleranzinduktion ist ein wichtiger Bestandteil des Immunsystems. Es ist normal, dass einige T-Zellen während der Thymus-Selektion nicht durch die Präsentation von körpereigenen Antigenen negativ selektioniert werden (Liu et al., 1995; Morgan et al., 1998; Zehn et al., 2006). Das liegt unter anderem daran, dass manche Ag im Thymus nicht ausreichend oder erst zu einem späteren Zeitpunkt präsentiert werden (Matzinger, 1994). Damit es trotzdem möglichst nicht zu Autoimmunerkrankungen kommt, bestehen neben den zentralen Toleranzmechanismen im Thymus weiterhin zahlreiche periphere Toleranzmechanismen, die diskutiert werden. Einer dieser Mechanismen soll durch klonale Ignoranz ermöglicht werden. Bei einer gesunden Gewebsstruktur treffen naive T-Zellen danach für gewöhnlich kein oder zu wenig gewebspezifisches Ag an (Kurts et al., 1998a; Mackay, 1993), sie können somit auch nicht autoreaktiv agieren. Einem neueren Bericht zufolge wurden jedoch in gesunden Mäusen naive T-Zellen auch in Geweben gefunden (Cose et al., 2006). Neben einigen anderen Mechanismen werden vor allem DC selbst als direkte Vermittler von Toleranz diskutiert. Am Rip-mOVA Mausmodell hat man besonders eindrucksvoll erarbeitet, dass CD8<sup>+</sup> DC in der Abwesenheit von Inflammation (*steady state*) kontinuierlich Selbstantigene aufnehmen, sie in die drainierenden Lymphknoten transportieren (Kurts et al., 1997; Redmond and Sherman, 2005) und durch Kreuzpräsentation der prozessierten Selbstantigene Toleranz in CD8<sup>+</sup> T-Zellen induzieren (Belz et al., 2002). Das pankreatische Modell-Selbst-Antigen OVA wird in diesen Mäusen unter der Kontrolle des gewebspezifischen Ratten-Insulin-Promotors (Rip) vor allem in den  $\beta$ -Inselzellen des Pankreas exprimiert. Durch normalen Zelltod können DC die nun apoptotischen, Selbstantigene enthaltenden Zellen, phagozytieren. CD8<sup>+</sup> DC, die im *steady state* das Gewebsantigen phagozytieren, reifen nicht vollständig heran und exprimieren nur wenig kostimulatorische Moleküle (Steinman et al., 2003). Eine darauf folgende T-Zell Stimulation resultiert in einem anfänglichen Proliferationsverhalten, welches aber schließlich

zu T-Zell Toleranz durch Deletion führt (Kurts et al., 1996; Kurts et al., 1998a; Kurts et al., 1997; Redmond and Sherman, 2005). Da OVA-spezifische T-Zellen nach einer entsprechenden Immunisierung nicht nachweisbar waren, scheint die Induktion von T-Zell Toleranz in Rip-mOVA Mäusen sehr effizient zu sein (Gallegos and Bevan, 2006).

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde ein reduziertes Proliferationsverhalten durch *cross-priming* von OT-I Zellen in CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> Mäusen beobachtet (Abb. 5.2). Daraus könnte möglicherweise auch eine Reduktion in der Induktion von T-Zell Toleranz resultieren, da T-Zell Proliferation für eine anschließende Toleranzinduktion benötigt wird. Um das herauszufinden, wurden die eben beschriebenen Rip-mOVA Mäuse mit den CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> Mäusen gekreuzt, um doppeltransgene Rac/Rip Mäuse zu generieren.

### 6.2.1 Gewebsspezifische Ag und CD8<sup>+</sup> T-Zell Proliferation in transgenen Mäusen

Der adoptive Transfer von CFSE-markierten OT-I Zellen in Rac/Rip Mäuse erlaubte zunächst einmal eine detaillierte Quantifizierung der OT-I Expansion. Der prozentuale Anteil sowie die totale Anzahl der sich teilenden Zellen in drainierenden LN waren in doppeltransgenen Mäusen im Vergleich zu Rip-mOVA Mäusen nach 68 h drei- bis vierfach reduziert (Abb. 5.19, a und 5.19, b). Die beobachtete Proliferation von OT-I Zellen in Rip-mOVA Mäusen geht konform mit Ergebnissen, die Kurts C et al. veröffentlicht haben. Hier wurde in Rip-mOVA Mäusen ein vergleichbares Proliferationsverhalten gesehen (Kurts et al., 1999). Jedoch konnte in diesem Zusammenhang nicht der Einfluss der Kreuzpräsentation auf die Proliferation von OVA-spezifischen T-Zellen erarbeitet werden. Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte jedoch erstmals *in vivo* dargelegt werden, dass der direkte Einfluss reduzierter Kreuzpräsentation zu einer stark verminderten Proliferation von Selbst-Ag-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen führt.

### 6.2.2 Gewebsspezifische Ag und periphere CD8<sup>+</sup> T-Zell Toleranz in transgenen Mäusen

Ob die verminderte Proliferation Ag-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch eine defekte Kreuzpräsentation auch die Induktion peripherer Toleranz hemmt, wurde als nächstes untersucht. Dazu wurden OT-I Zellen in Rac/Rip Mäuse transferiert und drei bis vier Wochen später analysiert. Während dieser Zeit wurden die Mäuse regelmäßig auf die Entwicklung von Diabetes untersucht, indem der Glukosewert im Urin gemessen wurde. Die Zeitspanne von



drei bis vier Wochen ist ausreichend für die Induktion einer T-Zell Toleranz und deren Deletion in normalen Mäusen (Kurts et al., 1997).

Ein erhöhter Glukosewert wurde weder in Rac/Rip Mäusen noch in Rip-mOVA Mäusen oder NTL beobachtet. Jedoch wurde nach drei Wochen im Blut im Vergleich zu Rip-mOVA Mäusen eine etwa zehnfache Menge OT-I Zellen in Rac/Rip Mäusen sowie NTL gemessen (Abb. 5.21 a). In Rip-OVA<sup>lo</sup> Mäusen, in denen die geringe Menge OVA (<0,03 ng OVA pro µg Protein der Inselzellen) anscheinend nicht für eine Kreuzpräsentation ausreicht, wurde nach vier Wochen ein OT-I Zell Repertoire beobachtet, das vergleichbar mit diesem Ergebnis war (Kurts et al., 1999). In diesem Zusammenhang wurde weiterhin gezeigt, dass die Deletion von OT-I Zellen in Rip-OVA<sup>lo</sup> Mäusen und somit eine Toleranzinduktion dadurch verhindert war. Dazu hat man Chimären erstellt, in denen Rip-OVA<sup>lo</sup> Mäuse als Rezipienten dienten. Ihnen wurden Knochenmarkszellen mit dem bm1 Haplotyp transferiert, die kein OVA an OT-I Zellen präsentieren können. Eine OT-I Deletion wurde in diesen Chimären nicht entdeckt. Da die Zellen *in vitro* aber restimulierbar waren, konnte geschlossen werden, dass die transferierten OT-I Zellen ignorant waren aber nicht anergisiert wurden. Insgesamt hat man Toleranz durch Deletion für relativ hohe Mengen sekretiertes OVA festgestellt (ab 1 ng/µg Protein) und Ignoranz für niedrige Mengen OVA (<0,03 ng/µg Protein). Rip-mOVA Mäuse exprimieren relativ hohe Mengen OVA (2,2 µg/mg Protein), die aber noch in einem physiologischen Bereich liegen, wenn man die Menge Insulin zum Vergleich heran zieht, die von den β-Inselzellen im Durchschnitt sezerniert wird (73 µg/mg Protein) (Heath and Carbone, 2001).

Es könnte also sein, dass die nicht tolerisierten OT-I Zellen, die in Rac/Rip Mäusen nach drei Wochen von den  $9 \times 10^6$  transferierten Zellen noch detektiert wurden, auch nicht anergisiert wurden. Sie sollten demnach noch stimulierbar sein.

Kurts C et al. haben 1997 ein ähnliches Experiment (wie unter 5.22) durchgeführt. Sie haben, um nach drei bis vier Wochen noch OT-I Zellen in unbestrahlten Rezipienten wieder zu finden, mindestens  $5 \times 10^6$  Zellen adoptiv transferiert. Unter diesen Umständen haben sie jedoch gesehen, dass die transferierten OT-I Zellen an Tag drei den Pankreas infiltrierten und an Tag fünf bis neun in 100% der Rezipienten Diabetes ausgelöst wurde. Kleinere Mengen an OT-I Zellen ( $0,25 \times 10^6$ ) haben kein Diabetes ausgelöst. Jedoch war bei Transfer einer so geringen Menge OT-I Zellen nach drei bis vier Wochen auch in NTL keine Detektion von OT-I Zellen mehr möglich. Diese Arbeitsgruppe hat damals aus den Ergebnissen geschlossen, dass das Immunsystem mit so einer unphysiologisch großen Menge OT-I Zellen nicht in ausreichendem Maße Toleranz induzieren kann. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen stehen

aber Beobachtungen, die im Rahmen dieser Arbeit erzielt wurden. Es wurden verschiedene Mengen OT-I Zellen (von  $10 \times 10^3$  bis  $10 \times 10^9$ ) in Rip-mOVA Mäuse injiziert, um zu untersuchen ab welcher OT-I Zellzahl Diabetes ausgelöst wird. In keinem der Fälle wurde interessanterweise eine Induktion von Diabetes verursacht (Daten nicht gezeigt). Das könnte daran liegen, dass die OT-I Zellen jeweils unterschiedlich präpariert wurden. Mit der im Rahmen dieser Doktorarbeit angewendeten Methode wurde eine Reinheit von mindestens 98 %  $CD8^+$  von PBL durch MACS Isolation erreicht, wovon mindestens 98 % OT-I Zellen waren. Die Wahrscheinlichkeit, dass die OT-I Zell Population verunreinigt war, war demnach relativ gering. Im Gegensatz dazu haben Kurts et al. die isolierten PBL aus OT-I LN und Milz lediglich durch Einsatz von anti-HSA und Komplement von Makrophagen und Erythrozyten befreit. Die somit isolierten Zellen waren damit wesentlich unreiner, sie enthielten 85-95 % OT-I Zellen (Wilson et al., 2006). Eine Kontamination mit  $CD4^+$  T-Zellen ist stark anzunehmen, denn eine OT-I Maus enthält immerhin noch um die 3 %  $CD4^+$  Zellen von PBL („Dissertation“ Scherer, Hans Ulrich, 2004), die die Induktion von T-Zell Toleranz beeinflussen könnten. Tatsächlich haben verschiedene Arbeitsgruppen herausgearbeitet, dass in einigen Modellen die  $CD4^+$  T-Zell Hilfe wichtig ist für die durch  $CD8^+$  T-Zellen vermittelte Induktion und Aufrechterhaltung von Immunantworten (Cardin et al., 1996; Fearon et al., 1990; Husmann and Bevan, 1988; Keene and Forman, 1982; von Herrath et al., 1996). Die  $CD4^+$  T-Zell Hilfe ist dabei jedoch nicht immer essentiell (Ahmed et al., 1988; Buller et al., 1987; Rahemtulla et al., 1991). Daneben haben verschiedene Arbeitsgruppen gezeigt, dass die  $CD4^+$  T-Zell Hilfe auch wichtig für die Unterdrückung der Induktion einer CTL Toleranz ist (Guerder and Matzinger, 1992; Kirberg et al., 1993; Rees et al., 1990). Kurts et al. (Kurts et al., 1997) haben noch im Jahre 1997 gezeigt, dass die Hilfe von  $CD4^+$  T-Zellen eine  $CD8^+$  T-Zell Deletion schwächt, welche durch Kreuzpräsentation von Selbstantigenen induziert wird und damit die Auslösung von Autoimmunität fördert. Dazu haben sie ein Gemisch aus  $CD4^+$  OT-II Zellen sowie eine geringe Anzahl OT-I Zellen ( $0,25 \times 10^6$ ) in Rip-mOVA Rezipienten injiziert, die dann diabetisch wurden. Die OT-I und OT-II Zellen wurden wie oben beschrieben mit anti-HSA und Komplement isoliert. Das bestätigt jedoch nicht, dass eine relativ hohe Menge OT-I Zellen ohne  $CD4^+$  T-Zell Hilfe nicht ausreichend tolerisiert wird. Es liegt näher, dass das OT-I Zellgemisch in der Arbeitsgruppe mit  $CD4^+$  T-Zellen verunreinigt war. Das würde erklären, dass im Rahmen dieser Doktorarbeit Toleranz auch induziert werden konnte, wenn die spezifischen  $CD8^+$  T-Zellen in relativ hohen Mengen vorhanden waren. Diese Beobachtung scheint unter Berücksichtigung der oben gemachten Ausführungen realistischer zu sein als diejenigen, die Kurts et al. (Kurts et al., 1997) gefunden haben.

Im Experiment 5.2.2 (Abb. 5.21) ist bis an Tag 26 nach Zelltransfer kein Diabetes ausgelöst worden. Rac/Rip Mäuse wiesen jedoch gegenüber Rip-mOVA Mäusen zu diesem Zeitpunkt eine OT-I Zellzahl auf, die um ein Vielfaches höher lag. Um den Toleranzstatus dieser OT-I Zellen in allen Rezipienten zu vergleichen, wurden sie mit HSV-OVA immunisiert, das eine direkte Präsentation von OVA vermitteln sollte. Wie erwartet waren die OT-I Zellen in Rip-mOVA Mäusen tolerant, es war vier Tage nach der Immunisierung keine Expansion der T-Zellen zu sehen. Im Kontrast dazu sind die OT-I Zellen in Rac/Rip Mäusen auf etwa ein Zwanzigfaches expandiert (Abb. 5.21 a). In NTL wurde ein vergleichbares Ergebnis gesehen, das hier darauf basiert, dass OVA ein Fremdantigen ist und Immunität ausgelöst wird. Die vorgenommene Messung des Glukosespiegels im Urin der Rac/Rip Mäuse hat Diabetes in allen Rezipienten bestätigt. Rac/Rip Mäuse hatten somit keinen ausreichenden Schutz durch Kreuztoleranz. Dahingegen waren alle Rip-mOVA Mäuse und NTL ausreichend geschützt, die Mäuse wurden nicht krank.

Die Erkenntnisse über die  $CD4^+$  T-Zell Hilfe in der Toleranzinduktion von  $CD8^+$  T-Zellen, die oben beschrieben wurden, könnten eine mögliche Strategie verdeutlichen, wie  $CD8^+$  T-Zellen unterscheiden können zwischen z.B. Virus-infizierten Zellen, die zerstört werden müssen und Zellen, die Selbstantigene exprimieren und intakt bleiben müssen. Im Rip-mOVA Modell war das  $CD4^+$  T-Zell Kompartiment tolerant gegenüber OVA weil es im Thymus negativ selektioniert wurde. Das könnte zu einer Induktion von Toleranz in OT-I Zellen führen. In Anwesenheit von Fremdantigenen, in der Immunität durch  $CD8^+$  T-Zellen ausgelöst werden soll, könnte im Gegensatz dazu die Induktion von Toleranz inhibiert werden, wenn spezifische  $CD4^+$  T-Zellen in der Peripherie vorhanden sind, die nicht tolerant sind.

In Anbetracht der relativ geringen Anzahl von T-Zellen, die regelmäßig aus dem Thymus in die Peripherie wandern, scheint das Immunsystem daher sehr gut gegen autoreaktive T-Zellen gewappnet zu sein. Es wurde in dieser Doktorarbeit gezeigt, dass dieser Schutz vor Autoimmunität stark beeinträchtigt wird, sobald die Kreuzpräsentation von Selbstantigenen an spezifische  $CD8^+$  T-Zellen nicht mehr voll funktioniert.

### 6.2.3 Die Rolle der Kreuzpräsentation in der Induktion zentraler CD8<sup>+</sup> T-Zell Toleranz

Es muss in Betracht gezogen werden, dass die negative Selektion von OVA-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Rac/Rip Mäusen durch Thymus-DC eventuell ebenso beeinträchtigt ist wie die periphere Kreuzpräsentation. Das würde bedeuten, dass bereits endogene OVA-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die der zentralen Toleranz entkommen sind, durch die Immunisierung mit HSV-OVA Diabetes verursacht haben könnten und nicht die transferierten OT-I Zellen. Das würde dann die eben beschriebene periphere Toleranz als verantwortlichen Schutzmechanismus vor Autoimmunreaktionen in Frage stellen. Obwohl bereits gezeigt wurde, dass Thymus-DC nicht essentiell sind, um im Thymus hoch affine OVA-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu deletieren (Gallegos and Bevan, 2006), sollte diese Möglichkeit konkret für dieses Experiment ausgeschlossen werden. Dazu wurden in einem Versuch in dieser Arbeitsgruppe Rac/Rip Mäuse sowie Rip-mOVA Mäuse und NTL, mit MVA-OVA immunisiert. Es wurden keine OT-I Zellen transferiert. Während alle Mäuse MVA-spezifische Immunantworten entwickelten, hat keine der Mausgruppen bis an Tag 25 nach Immunisierung OVA<sub>257-264</sub>-spezifische T-Zell Antworten oder Induktion von Diabetes gezeigt (Daten nicht gezeigt). Damit konnte ausgeschlossen werden, dass endogene hoch affine OVA-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Rac/Rip Mäusen vorhanden waren, die eine Induktion von Diabetes verursachten. Die negative Selektion OVA<sub>257-264</sub>-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Thymus schien demnach in Rac/Rip Mäusen funktionell zu sein. Weiterhin konnte mit diesem Versuch bestätigt werden, dass die Induktion von Diabetes in Rac/Rip Mäusen auf einer verminderten Fähigkeit der DC beruhte, das Selbstantigen OVA zu präsentieren und periphere Toleranz zu induzieren.

Im eben beschriebenen Verfahren wurde ein eventuelles Vorhandensein endogener OVA<sub>257-264</sub>-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen untersucht. CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die für andere Selbstantigene spezifisch sind oder CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die eine relativ niedrige Affinität zu OVA aufweisen, wurden hiermit noch nicht berücksichtigt. Solch potentiell autoreaktive T-Zellen in Rac1 defizienten Mäusen könnte man möglicherweise nachweisen, indem man sie in Wildtypmäuse transferiert, in denen das *cross-priming* normal funktioniert. Genau solch ein Experiment wurde im Abschnitt 5.2.3 durchgeführt. Es wurden CFSE-markierte CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> Milz-T-Zellen aus CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> Mäusen bzw. NTL (beide Thy1.2<sup>+</sup>) in C57BL/6 Thy1.1 Rezipienten transferiert. Nach fünfzehn Tagen wurden die Milzen der Rezipienten durchflusszytometrisch analysiert. Auch hier wäre eine Zellteilung anhand einer CFSE-Verdünnung detektierbar. Wie bereits erwähnt wurde in einer von zwei transgenen, nicht aber in NTL eine starke CFSE-Verdünnung beobachtet (Abb. 5.23). In einem weiteren

Versuch wurden in drei von vier Mäusen starke CFSE-Verdünnungen beobachtet, die für eine Zellteilung sprechen (Daten nicht gezeigt). Die CFSE-Verdünnung betrug etwa ein Hundertfaches vom Ausgangswert. Nach Berechnungen, die in Kurts et al. zu finden sind (Kurts et al., 1997), müsste bei dieser Verdünnung auf etwa fünf bis sechs Teilungen zu schließen sein, wenn eine Zelle, die  $n$  Teilungen erlebt hat noch eine Fluoreszenzintensität von  $2^n$  hat. Diese Daten bestätigen die Existenz von potentiell selbstreaktiven  $CD8^+$  T-Zellen in der Peripherie  $Rac1$  defizienter Mäuse in etwa 66 % der Fälle. Es könnte sich hier um niedrig affine  $CD8^+$  T-Zellen handeln, die in der Peripherie nicht aktiviert werden, sondern ignorant bleiben (Ohashi et al., 1991; Oldstone et al., 1991). Das würde erklären, dass die  $CD11c-Rac1(N17)$   $Tg^+$  Mäuse nicht grundsätzlich krank sind.

Insgesamt lassen die erarbeiteten Daten darauf schließen, dass die Induktion von zentraler T-Zell Toleranz in Thymi mit  $Rac1$  defekten DC normal ist. Es lassen sich jedoch potentiell autoreaktive CTL in  $CD11c-Rac1(N17)$   $Tg^+$  Mäusen nachweisen.

#### 6.2.4 Die Funktionalität potentiell autoreaktiver T-Zellen im GVHD-Modell

Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass diese potentiell autoreaktiven  $CD8^+$  T-Zellen nicht grundsätzlich ignorant sind. Möglicherweise können ihnen die spezifischen Antigene nur nicht präsentiert werden, weil die DC in  $CD11c-Rac1(N17)$   $Tg^+$  Mäusen sie nicht ausreichend kreuzpräsentieren können. Wie funktionell diese T-Zellen wirklich sind, sollte mit dem folgenden Experiment gezeigt werden. Die Idee war, diese T-Zellen in syngene Wildtyp-Rezipienten zu übertragen, in denen die Kreuzpräsentation normal funktioniert. Wenn in diesem Modell eine Aktivierung transferierter T-Zellen möglich wäre, weil ihnen nun spezifische Ag präsentiert werden, könnte man eventuell CTL-Effektorfunktionen nachweisen. Diese Effektorfunktionen wären vermutlich gegen alle möglichen Gewebs-Selbstantigene im Empfänger gerichtet. Wenn man die Rezipienten zuvor bestrahlt, um eine Abstoßung von Donor-T-Zellen (HVGR) zu vermeiden, dann könnten aktivierte CTL in die peripheren Gewebe einwandern und Zielzellen direkt zerstören. Da sich solch eine Transplantat-gegen-Empfänger Reaktion anhand von in 5.2.4 beschriebenen Symptomen auswerten lässt, handelt es sich um einen aussagekräftigen funktionellen Test. Mit diesem Test könnte erstmals beschrieben werden, welche Rolle die Kreuzpräsentation *in vivo* in der Kontrolle von Autoimmunerkrankungen einnimmt.

Ein besonders gut untersuchtes Kontrollsystem stellt die BALB.B Maus dar. Sie ist im Vergleich zu C57BL/6 Mäusen syngen, unterscheidet sich aber in 29 mHAg von ihnen. Der

Transfer von isolierten Donor T-Zellen und T-Zell-depletiertem Knochenmark verursachten in BALB.B Mäusen, die mit 750 bis 800 rad bestrahlt wurden, eine extrem hohe Mortalität (Korngold and Sprent, 1987). Große Mengen transferierter T-Zellen (ab  $3 \times 10^5$ ) induzierten eine akute GVHD mit einem schnellen Tod innerhalb von zehn bis vierzig Tagen (Korngold and Sprent, 1987 and Korngold & Sprent; ED Thomas Blume, Hematopoietic cell transplantation. 2nd ed. Blackwell 1999). Eine relativ starke Bestrahlung (800 bis 1000 rad) kann dabei im Vergleich zu leichten Bestrahlungen (600 bis 800 rad) zu einem erhöhten Schweregrad der Erkrankung führen.

Es wurde in dem hier durchgeführten Experiment keiner der Transplantat-Empfänger krank, entgegen der ursprünglichen Vermutung nicht einmal die Kontrollmäuse (5.2.4 und Abb. 5.24). Keine der Mäuse ist bis zum Ende des Versuchszeitraumes gestorben.

Wie im Nachhinein gefunden wurde, hängt das damit zusammen, dass nur  $CD8^+$  T-Zellen, nicht aber  $CD4^+$  T-Zellen transplantiert wurden. Es wird zwar in der Literatur diskutiert, dass  $CD8^+$  T-Zellen nicht zwingend auf die Hilfe von  $CD4^+$  T-Zellen angewiesen sind, um eine GVHD gegen mHAgS auszulösen. Mit einigen Kombinationen von Mauslinien wurde herausgearbeitet, dass isolierte  $CD8^+$  T-Zellen potente GVHD-Induzierer waren (Korngold and Sprent, 1987). Jedoch waren in anderen Kombinationen  $CD8^+$  T-Zellen abhängig von  $CD4^+$  T-Zell Hilfe,  $CD4^+$  T-Zellen können sogar in einigen Fällen selbst potente GVHD Antworten auslösen. Es wurde vermutet, dass die Art der mHAgS in den Mauslinien darüber entscheidet, welche  $CD4^+$  T-Zell Gruppen ( $T_{h1}$  oder  $T_{h2}$ ) stimuliert werden (Korngold & Sprent; Hematopoietic cell transplantation, 1999). Anscheinend favorisieren bestimmte mHAgS eine ( $CD4^+$  T-Zell-) unabhängige  $CD8^+$  T-Zell Antwort. Solche mHAgS wurden jedoch in BALB.B Mäusen nicht gefunden (Berger et al., 1994). Das erklärt, warum die BALB.B Mäuse in diesem Experiment nicht krank geworden sind. Als Positivkontrolle könnte man sie demnach heranziehen, wenn ihnen neben Knochenmarkszellen und  $CD8^+$  T-Zellen auch  $CD4^+$  T-Zellen von den Donoren transplantiert werden. Als Konsequenz daraus soll das Experiment im Anschluss an diese Doktorarbeit wiederholt werden, und zwar unter Berücksichtigung von  $CD4^+$  T-Zellen. Dann könnten über eine Funktionalität der potentiell selbstreaktiven  $CD8^+$  T-Zellen in  $CD11c$ - $Rac1(N17)$   $Tg^+$  Mäusen möglicherweise die gewünschten Erkenntnisse erzielt werden.

Zusammengefasst ist das *cross-priming* potentiell autoreaktiver  $CD8^+$  T-Zellen, induziert durch mHAgS präsentierende DC in BALB.B Rezipienten, *in vivo* abhängig von der  $CD4^+$  T-Zell Hilfe. Da auch in der  $CD11c$ - $Rac1(N17)$   $\rightarrow$  C57BL/6 Kombination keine GVHR (Autoimmunität) ausgelöst wurde, muss eine vergleichbare Rolle der  $CD4^+$  T-Zellen zumindest in Betracht gezogen werden. Zum jetzigen Zeitpunkt lassen die Ergebnisse noch keine haltbaren Schlussfolgerungen zu.

Insgesamt demonstrieren die in dieser Doktorarbeit ermittelten Daten eine zentrale Rolle der Rac1 GTPase in der Kontrolle von Kreuzpräsentation von Gewebs-Selbstantigenen durch DC. Das Eingreifen in die Funktion von Rac1 in DC reduziert die Fähigkeit von DC zur Kreuzpräsentation und die Induktion von Toleranz. Potentiell autoreaktive CD8<sup>+</sup> T-Zellen in peripheren Organen können durch verminderte Kreuztoleranz fortbestehen und gegebenenfalls zu Effektor-T-Zellen aktiviert werden, die in diesem Fall die Zerstörung von Geweben verursachen. Eine dadurch erhöhte Prädisposition für Autoimmunität ist nicht auszuschließen. Eine reduzierte Fähigkeit zur Kreuzpräsentation basiert in CD11c-Rac1(N17) Tg<sup>+</sup> Mäusen zumindest teilweise auf einer reduzierten Ag-Aufnahme. Funktionierende Signalkaskaden und Rezeptoren, die die Aufnahme von Selbstantigenen kontrollieren, könnten daher der Hauptfaktor im Immunsystem sein, damit die Induktion peripherer Toleranz funktionieren kann.

### **6.3 Die Bedeutung der Kreuztoleranz für therapeutische Ansätze**

Bei Autoimmunerkrankungen kommt es zu schweren Entzündungsreaktionen, die zu Schäden in den betroffenen Organen führen. Die genaue Ursache von Autoimmunerkrankungen ist trotz intensiver Forschung weiterhin unklar. Als Ursache kommen genetische Faktoren, sowie Umweltfaktoren in Frage. An den mehr als 80 verschiedenen Autoimmunkrankheiten leiden insgesamt schätzungsweise 5–8 % der Bevölkerung. Allein in den USA sind 22 Millionen Personen davon betroffen. Die meisten dieser Erkrankungen sind in hohem Masse schwächend und werden nicht ausreichend behandelt. Dadurch werden sie zu einer bedeutenden gesellschaftlichen und finanziellen Belastung. Zur Therapierung werden meist Medikamente verwendet, die die Aktivierung des Immunsystems dämpfen. Dazu zählen unter anderem Kortison oder Immunsuppressiva, die jedoch mannigfaltige systemische Nebenwirkungen verursachen. Zudem wird die Krankheit nicht spezifisch behandelt und ist nicht langlebig. Etwa 5-10 % aller Diabetiker weltweit leiden unter Diabetes mellitus Typ-1, das auf der Zerstörung von  $\beta$ -Inselzellen im Pankreas basiert. Allein in Deutschland gibt es zurzeit etwa 200.000 Erkrankte des Diabetes mellitus Typ-1 und pro Jahr kommen etwa 15.000 neue Fälle hinzu. Durch den stetigen Abbau von  $\beta$ -Inselzellen fehlt den Körperzellen das Hormon Insulin und sie können kein Zucker, der für Stoffwechsel benötigt wird, aus dem Blut aufnehmen. Die bis heute konventionell angewandte Therapie ist das lebenslange Spritzen von Insulin. Eine Heilung ist jedoch noch nicht möglich, einige mögliche Ansätze für Heilungsmethoden werden aber in der Literatur diskutiert.

Zum einen ist es heute möglich, die Insulin produzierenden Zellen der Bauchspeicheldrüse zu isolieren und zu transplantieren. Nach der Operation müssen die Patienten kein oder nur sehr wenig Insulin spritzen. Wie nach jeder Transplantation müssen sie aber bestimmte Medikamente einnehmen, die das Immunsystem schwächen, damit der Körper die transplantierten Zellen nicht zerstört. Daher wird dieser Eingriff nur bei wenigen Patienten durchgeführt.

Im Diabetes mellitus Typ-1 sind einige  $\beta$ -Zell-Autoantigene wie unter anderem das Insulin bekannt, gegen die autoreaktive T-Zellen gerichtet sind (Yoon and Jun, 2005). Eine antigenspezifische Behandlung, die an Mausmodellen ausgetestet wurde, ist die systemische Verabreichung agonistischer Peptide oder von MHC-Peptid-Komplexen. Damit wurde erreicht, dass  $CD8^+$  T-Zellen deletiert oder anergisiert wurden (Liblau et al., 2002). Die Peptide sind jedoch kurzlebig und eine wiederholte Verabreichung ist nötig. Eine Ag-spezifische Therapie wird zudem ineffizient, wenn die Krankheit bereits vorgeschritten ist. Es sind spezifische Strategien nötig, die auch bei fortgeschrittener Krankheit wirksam einsetzbar sind. Die Blockade von  $TNF\alpha$ , ein T-Zell Zytokin, wurde bereits bei einigen Autoimmunkrankheiten mit mäßigem Erfolg eingesetzt. Die Blockade von Molekülen, die beteiligt sind an Chemoattraktion, *rolling*, Adhäsion und Transmigration werden ebenfalls als therapeutisches Werkzeug diskutiert (Liblau et al., 2002). Diese Methoden sind jedoch unspezifisch und bergen Gefahren wie z.B. ein erhöhtes Risiko für Infektionskrankheiten. Eine antigenspezifische Toleranzinduktion in T-Zellen, die an der Zerstörung von Geweben beteiligt sind, ist daher ein bevorzugter Ansatzpunkt für gezielte Studien zur Behandlung von Autoimmunkrankheiten.

Ein Ansatzpunkt könnte die spezifische Kreuzpräsentation von Antigenen durch DC unter nichtinflammatorischen Bedingungen sein, um periphere Toleranz von selbstreaktiven  $CD8^+$  T-Zellen zu erreichen. Ursprünglich wurde Kreuzpräsentation als nebensächliche Variante dargestellt, CTL zu stimulieren. Heute ist jedoch klar, dass die Kreuzpräsentation der Hauptmechanismus für das Überleben von Geweben im Immunsystem darstellt. Angesichts der zentralen Rolle, die DC allgemein in der Kontrolle von Immunität einnehmen, stellen sie ein Objekt zahlreicher klinischer Studien dar, in der T-Zellen involviert sind. So wird z.B. große Hoffnung gesetzt in die Behandlung von Autoimmunität, Allergien und in erfolgreiches Transplantieren von Organen mit DC.

Es wird vermutet, dass Kreuzpräsentation von Selbstantigenen unter nicht inflammatorischen Bedingungen  $CD8^+$  T-Zell Toleranz induziert und aufrechterhält. Um dieses Ziel zu erreichen, wurden  $CD8^+$  T-Zellen in der Abwesenheit von Kostimulation ihrem spezifischen



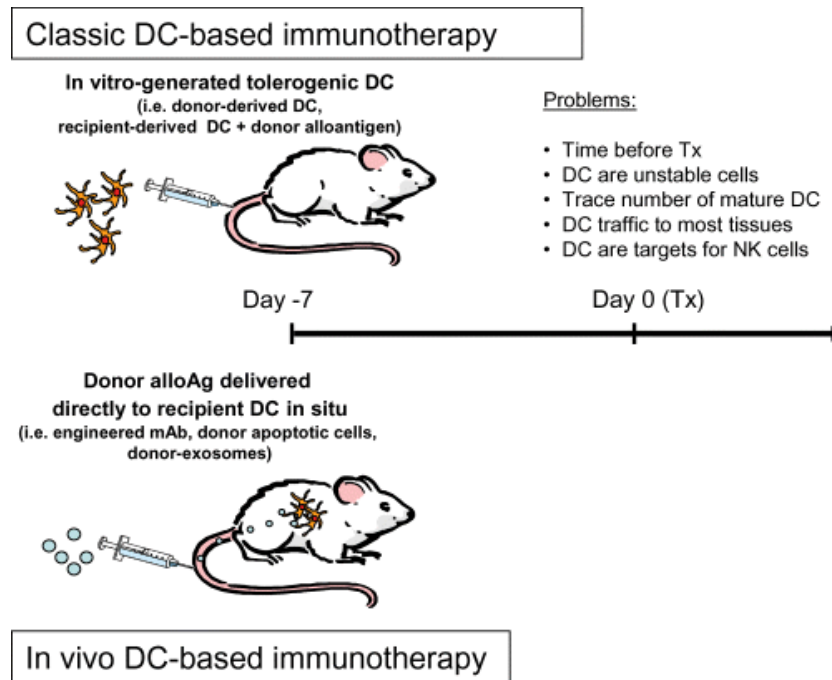
Antigen ausgesetzt (Wekerle et al., 2002). Im Falle von Transplantaten hat man jedoch beobachtet, dass eher eine Anergie anstatt Deletion von spezifischen T-Zellen verursacht wird. Anergische Zellen können die Fähigkeit, aktiviert zu werden, wiedererlangen (Rocha et al., 1993; Schwartz, 2003). Daher würde diese Behandlungsmethode eine ständige Blockade von kostimulatorischen Molekülen beinhalten bzw. eine dauerhafte Behandlung mit immunsuppressiven Medikamenten, um das Transplantat nicht zu verlieren. Es ist demnach von grundlegender Bedeutung, die Möglichkeit der Toleranzinduktion weiter zu erforschen. Besonders wichtig ist es herauszufinden, unter welchen Umständen Deletion bzw. Anergie verursacht wird.

Bisher liegen kaum *in vivo* Studien vor, die die Rolle der Kreuzpräsentation in der peripheren Toleranzinduktion einbeziehen. Es wurden zwar bereits  $Rac1^{-/-}/Rac2^{-/-}$  Doppelknockout Mäuse verwendet, die einen generellen Defekt in der Aktivierung von T-Zellen haben, aber mit diesen Mäusen konnte nicht spezifisch der Einfluss von Kreuzpräsentation auf die periphere Toleranzinduktion untersucht werden (Benvenuti et al., 2004). Der spezifische Defekt in den hier verwendeten CD11c-Rac1(N17)  $Tg^{+}$  Mäusen tangiert dahingegen lediglich die Kreuzpräsentation von exogenen Antigenen. Da die  $CD8^{+}$  T-Zell Toleranz in Rip-mOVA Mäusen unter gewöhnlichen Umständen sehr effizient ist (Gallegos and Bevan, 2006), wurde durch die Kreuzung mit CD11c-Rac1(N17)  $Tg^{+}$  Mäusen ein System geschaffen, indem direkt der Effekt von Kreuzpräsentation auf die Periphere Toleranzentwicklung studiert werden kann. Die Relevanz der Kreuzpräsentation für die Induktion peripherer Toleranz durch DC wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit erstmals *in vivo* gezeigt. Durch verminderte Kreuzpräsentation wurde *in vivo* autoimmunes Diabetes ausgelöst.

Der Einsatz von CD11c-Rac1(N17)  $Tg^{+}$  Mäusen könnte in weiteren Studien verbunden werden mit Strategien, die z.B. die Nutzung apoptotischer Zellen und Exosomen für die Regulation der Toleranzinduktion beinhalten (Morelli, 2006).

Apoptotische Zellen sind unter stressfreien Bedingungen bekanntermaßen tolerogen (Iyoda et al., 2002; Morelli et al., 2003). Exosomen, die als zelluläre Vesikel fungieren und Moleküle von Zelle zu Zelle transportieren (Fevrier et al., 2005; Thery et al., 2002b), können an direkter Präsentation und Kreuzpräsentation von Antigenen an T-Zellen beteiligt sein (Andre et al., 2002). Es wurde bereits gezeigt, dass die intravenöse Verabreichung von allogenen Exosomen dazu führt, dass DC, ohne zu reifen, die exogenen transferierten Ag im MHC-Klasse I Kontext T-Zellen präsentieren können (Morelli, 2006). Eine Verbesserung der Annahme eines Herztransplantats wurde an Ratten gezeigt, indem Exosomen i.v. injiziert wurden, die von unreifen Donor-DC stammten (Peché et al., 2003) (siehe auch schematische Darstellung 6.1).

Zurzeit wird an Methoden gearbeitet, mit denen rekombinante Exosomen entwickelt werden sollen, die immunregulatorische Moleküle tragen.



**Abb. 6.1: DC-basierte Anwendungsmöglichkeiten für die Herabregulierung von anti-Donor Antworten.** (Morelli, 2006)

Exosomen können aber ebenso für die Steigerung von Immunität verwendet werden. Die Rolle der Exosomen in der Induktion von Toleranz oder Immunität hängt von dessen intrinsischem Charakter ab (Segura et al., 2005; Skokos et al., 2001) und vom Typ und dem Aktivierungszustand der Zellen, von denen Exosomen abstammen. Die Umgebung der Interaktion zwischen DC und Exosom spielt dabei ebenso eine wesentliche Rolle. Apoptotische Donorzellen wurden verwendet, um eine Zellbasierte Therapie zu entwickeln, die Immuntoleranz induziert (Kleinclauss et al., 2003). Die Akzeptanz eines Herztransplantats ohne Gabe von Immunsuppressiva wurde in Ratten enorm verbessert, indem vor Transplantation apoptotische Donor-Milzzellen injiziert wurden (Sun et al., 2004). Auch am Menschen wurde Kreuztoleranz allogener T-Zellen *in vitro* demonstriert, nachdem humane unreife DC mit allogenen apoptotischen Zellen gefüttert wurden (Nouri-Shirazi and Guinet, 2002). Die Infusion von apoptotischen Donorzellen könnte demnach zu einer Toleranz von

Transplantaten beitragen. Ebenso vorstellbar wäre eine Behandlung von Autoimmunkrankheiten mit Exosomen oder apoptotischen Zellen, um tolerogene DC zu generieren. Im Rahmen von Studien zur Behandlung von autoimmunem Diabetes wurden bisher noch nicht sehr große Erfolge erreicht. Es ist anscheinend möglich, vor Manifestierung der Krankheit einen limitierten Zelltod in den  $\beta$ -Inselzellen des Pankreas zu induzieren, und damit die Induktion einer T-Zell Toleranz zu forcieren. NOD Mäuse wurden so vor einer Diabetesentwicklung bewahrt (Hugues et al., 2002). Jedoch ist dies eine Methode, die bei bereits bestehender Krankheit nicht mehr anschlägt. Auf diesem Feld sind offensichtlich noch langwierige Studien nötig, die sich dem Trend nach zu urteilen hauptsächlich auf Erkenntnisse der Toleranzinduktion durch Kreuzpräsentation stützen werden.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

Abrams, J. R., Kelley, S. L., Hayes, E., Kikuchi, T., Brown, M. J., Kang, S., Lebwohl, M. G., Guzzo, C. A., Jegasothy, B. V., Linsley, P. S., and Krueger, J. G. (2000). Blockade of T lymphocyte costimulation with cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4-immunoglobulin (CTLA4Ig) reverses the cellular pathology of psoriatic plaques, including the activation of keratinocytes, dendritic cells, and endothelial cells. *J Exp Med* 192, 681-694.

Ackerman, A. L., Kyritsis, C., Tampe, R., and Cresswell, P. (2003). Early phagosomes in dendritic cells form a cellular compartment sufficient for cross presentation of exogenous antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 12889-12894.

Aderem, A., and Ulevitch, R. J. (2000). Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406, 782-787.

Ahmed, R., Butler, L. D., and Bhatti, L. (1988). T4+ T helper cell function in vivo: differential requirement for induction of antiviral cytotoxic T-cell and antibody responses. *J Virol* 62, 2102-2106.

Albert, M. L., Kim, J. I., and Birge, R. B. (2000).  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 integrin recruits the CrkII-Dock180-rac1 complex for phagocytosis of apoptotic cells. *Nat Cell Biol* 2, 899-905.

Albert, M. L., Pearce, S. F., Francisco, L. M., Sauter, B., Roy, P., Silverstein, R. L., and Bhardwaj, N. (1998a). Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 188, 1359-1368.

Albert, M. L., Sauter, B., and Bhardwaj, N. (1998b). Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 392, 86-89.

Amigorena, S., and Bonnerot, C. (1999a). Fc receptor signaling and trafficking: a connection for antigen processing. *Immunol Rev* 172, 279-284.

Amigorena, S., and Bonnerot, C. (1999b). Fc receptors for IgG and antigen presentation on MHC class I and class II molecules. *Semin Immunol* 11, 385-390.

Anderson, G., Moore, N. C., Owen, J. J., and Jenkinson, E. J. (1996). Cellular interactions in thymocyte development. *Annu Rev Immunol* 14, 73-99.

Anderson, M. S., Venzani, E. S., Klein, L., Chen, Z., Berzins, S. P., Turley, S. J., von Boehmer, H., Bronson, R., Dierich, A., Benoist, C., and Mathis, D. (2002). Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* 298, 1395-1401.

Andre, F., Scharz, N. E., Movassagh, M., Flament, C., Pautier, P., Morice, P., Pomel, C., Lhomme, C., Escudier, B., Le Chevalier, T., *et al.* (2002). Malignant effusions and immunogenic tumour-derived exosomes. *Lancet* 360, 295-305.

- Asselin-Paturel, C., Boonstra, A., Dalod, M., Durand, I., Yessaad, N., Dezutter-Dambuyant, C., Vicari, A., O'Garra, A., Biron, C., Briere, F., and Trinchieri, G. (2001). Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nat Immunol* 2, 1144-1150.
- Baekkevold, E. S., Yamanaka, T., Palframan, R. T., Carlsen, H. S., Reinholt, F. P., von Andrian, U. H., Brandtzaeg, P., and Haraldsen, G. (2001). The CCR7 ligand elc (CCL19) is transcytosed in high endothelial venules and mediates T cell recruitment. *J Exp Med* 193, 1105-1112.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Pulendran, B., and Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18, 767-811.
- Banchereau, J., and Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252.
- Barrett, S. P., van Driel, I. R., Tan, S. S., Alderuccio, F., Toh, B. H., and Gleeson, P. A. (1995). Expression of a gastric autoantigen in pancreatic islets results in non-destructive insulinitis after neonatal thymectomy. *Eur J Immunol* 25, 2686-2694.
- Basu, S., Binder, R. J., Suto, R., Anderson, K. M., and Srivastava, P. K. (2000). Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. *Int Immunol* 12, 1539-1546.
- Bell, D., Young, J. W., and Banchereau, J. (1999). Dendritic cells. *Adv Immunol* 72, 255-324.
- Bellone, M., Iezzi, G., Rovere, P., Galati, G., Ronchetti, A., Protti, M. P., Davoust, J., Rugarli, C., and Manfredi, A. A. (1997). Processing of engulfed apoptotic bodies yields T cell epitopes. *J Immunol* 159, 5391-5399.
- Belz, G. T., Behrens, G. M., Smith, C. M., Miller, J. F., Jones, C., Lejon, K., Fathman, C. G., Mueller, S. N., Shortman, K., Carbone, F. R., and Heath, W. R. (2002). The CD8alpha(+) dendritic cell is responsible for inducing peripheral self-tolerance to tissue-associated antigens. *J Exp Med* 196, 1099-1104.
- Bensinger, S. J., Bandeira, A., Jordan, M. S., Caton, A. J., and Laufer, T. M. (2001). Major histocompatibility complex class II-positive cortical epithelium mediates the selection of CD4(+)25(+) immunoregulatory T cells. *J Exp Med* 194, 427-438.
- Benvenuti, F., Hugues, S., Walmsley, M., Ruf, S., Fetler, L., Popoff, M., Tybulewicz, V. L., and Amigorena, S. (2004). Requirement of Rac1 and Rac2 expression by mature dendritic cells for T cell priming. *Science* 305, 1150-1153.
- Berard, F., Blanco, P., Davoust, J., Neidhart-Berard, E. M., Nouri-Shirazi, M., Taquet, N., Rimoldi, D., Cerottini, J. C., Banchereau, J., and Palucka, A. K. (2000). Cross-priming of naive CD8 T cells against melanoma antigens using dendritic cells loaded with killed allogeneic melanoma cells. *J Exp Med* 192, 1535-1544.

- Berger, M., Wettstein, P. J., and Korngold, R. (1994). T cell subsets involved in lethal graft-versus-host disease directed to immunodominant minor histocompatibility antigens. *Transplantation* 57, 1095-1102.
- Bevan, M. J. (1976). Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *J Exp Med* 143, 1283-1288.
- Bevan, M. J. (1977). In a radiation chimaera, host H-2 antigens determine immune responsiveness of donor cytotoxic cells. *Nature* 269, 417-418.
- Bishop, A. L., and Hall, A. (2000). Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* 348 Pt 2, 241-255.
- Boguski, M. S., and McCormick, F. (1993). Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* 366, 643-654.
- Boise, L. H., Minn, A. J., Noel, P. J., June, C. H., Accavitti, M. A., Lindsten, T., and Thompson, C. B. (1995). CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity* 3, 87-98.
- Bruno, L., Seidl, T., and Lanzavecchia, A. (2001). Mouse pre-immunocytes as non-proliferating multipotent precursors of macrophages, interferon-producing cells, CD8alpha(+) and CD8alpha(-) dendritic cells. *Eur J Immunol* 31, 3403-3412.
- Buller, R. M., Holmes, K. L., Hugin, A., Frederickson, T. N., and Morse, H. C., 3rd (1987). Induction of cytotoxic T-cell responses in vivo in the absence of CD4 helper cells. *Nature* 328, 77-79.
- Burgdorf, S., Lukacs-Kornek, V., and Kurts, C. (2006). The mannose receptor mediates uptake of soluble but not of cell-associated antigen for cross-presentation. *J Immunol* 176, 6770-6776.
- Butz, E. A., and Bevan, M. J. (1998). Massive expansion of antigen-specific CD8+ T cells during an acute virus infection. *Immunity* 8, 167-175.
- Callan, M. F., Tan, L., Annels, N., Ogg, G. S., Wilson, J. D., O'Callaghan, C. A., Steven, N., McMichael, A. J., and Rickinson, A. B. (1998). Direct visualization of antigen-specific CD8+ T cells during the primary immune response to Epstein-Barr virus In vivo. *J Exp Med* 187, 1395-1402.
- Cardin, R. D., Brooks, J. W., Sarawar, S. R., and Doherty, P. C. (1996). Progressive loss of CD8+ T cell-mediated control of a gamma-herpesvirus in the absence of CD4+ T cells. *J Exp Med* 184, 863-871.
- Caux, C., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Dubois, B., Van Kooten, C., Durand, I., and Banchereau, J. (1994). Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J Exp Med* 180, 1263-1272.

- Cella, M., Scheidegger, D., Palmer-Lehmann, K., Lane, P., Lanzavecchia, A., and Alber, G. (1996). Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med* 184, 747-752.
- Chien, A., Edgar, D. B., and Trela, J. M. (1976). Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol* 127, 1550-1557.
- Cohen, J. (2002). The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 420, 885-891.
- Coles, R. M., Mueller, S. N., Heath, W. R., Carbone, F. R., and Brooks, A. G. (2002). Progression of armed CTL from draining lymph node to spleen shortly after localized infection with herpes simplex virus 1. *J Immunol* 168, 834-838.
- Cooke, K. R., Kobzik, L., Martin, T. R., Brewer, J., Delmonte, J., Jr., Crawford, J. M., and Ferrara, J. L. (1996). An experimental model of idiopathic pneumonia syndrome after bone marrow transplantation: I. The roles of minor H antigens and endotoxin. *Blood* 88, 3230-3239.
- Cose, S., Brammer, C., Khanna K. M., Masopust D. and Lefrançois L. (2006). Evidence that a significant number of naive T cells enter non-lymphoid organs as part of a normal migratory pathway. *Eur J Immuno* 36, 1423-1433.
- Cresswell, P. (1996). Invariant chain structure and MHC class II function. *Cell* 84, 505-507.
- Curtsinger, J. M., Lins, D. C., and Mescher, M. F. (2003). Signal 3 determines tolerance versus full activation of naive CD8 T cells: dissociating proliferation and development of effector function. *J Exp Med* 197, 1141-1151.
- d'Ostiani, C. F., Del Sero, G., Bacci, A., Montagnoli, C., Spreca, A., Mencacci, A., Ricciardi-Castagnoli, P., and Romani, L. (2000). Dendritic cells discriminate between yeasts and hyphae of the fungus *Candida albicans*. Implications for initiation of T helper cell immunity in vitro and in vivo. *J Exp Med* 191, 1661-1674.
- De Smedt, T., Pajak, B., Muraille, E., Lespagnard, L., Heinen, E., De Baetselier, P., Urbain, J., Leo, O., and Moser, M. (1996). Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo. *J Exp Med* 184, 1413-1424.
- den Haan, J. M., Lehar, S. M., and Bevan, M. J. (2000). CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *J Exp Med* 192, 1685-1696.
- Denzer, K., Kleijmeer, M. J., Heijnen, H. F., Stoorvogel, W., and Geuze, H. J. (2000). Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. *J Cell Sci* 113 Pt 19, 3365-3374.
- Dieckmann, D., Plottner, H., Berchtold, S., Berger, T., and Schuler, G. (2001). Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med* 193, 1303-1310.
- Doherty, P. C. (1998). The numbers game for virus-specific CD8+ T cells. *Science* 280, 227.

- Drexhage, H. A., Mullink, H., de Groot, J., Clarke, J., and Balfour, B. M. (1979). A study of cells present in peripheral lymph of pigs with special reference to a type of cell resembling the Langerhans cell. *Cell Tissue Res* 202, 407-430.
- Enk, A. H., and Katz, S. I. (1992). Early molecular events in the induction phase of contact sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 1398-1402.
- Etienne-Manneville, S., and Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420, 629-635.
- Fearon, E. R., Pardoll, D. M., Itaya, T., Golumbek, P., Levitsky, H. I., Simons, J. W., Karasuyama, H., Vogelstein, B., and Frost, P. (1990). Interleukin-2 production by tumor cells bypasses T helper function in the generation of an antitumor response. *Cell* 60, 397-403.
- Fehervari, Z., and Sakaguchi, S. (2004). CD4+ Tregs and immune control. *J Clin Invest* 114, 1209-1217.
- Fevrier, B., Vilette, D., Laude, H., and Raposo, G. (2005). Exosomes: a bubble ride for prions? *Traffic* 6, 10-17.
- Flores-Romo, L. (2001). In vivo maturation and migration of dendritic cells. *Immunology* 102, 255-262.
- Freedman, H. A., and Lilly, F. (1975). Properties of cell lines derived from tumors induced by Friend virus in BALB/c and BALB/c-H-2b mice. *J Exp Med* 142, 212-223.
- Freudenberg, M. A., Meier-Dieter, U., Staehelin, T., and Galanos, C. (1991). Analysis of LPS released from *Salmonella abortus equi* in human serum. *Microb Pathog* 10, 93-104.
- Friedman, T. M., Gilbert, M., Briggs, C., and Korngold, R. (1998). Repertoire analysis of CD8+ T cell responses to minor histocompatibility antigens involved in graft-versus-host disease. *J Immunol* 161, 41-48.
- Gallegos, A. M., and Bevan, M. J. (2004). Central tolerance to tissue-specific antigens mediated by direct and indirect antigen presentation. *J Exp Med* 200, 1039-1049.
- Gallegos, A. M., and Bevan, M. J. (2006). Central tolerance: good but imperfect. *Immunol Rev* 209, 290-296.
- Gallucci, S., Lolkema, M., and Matzinger, P. (1999). Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nat Med* 5, 1249-1255.
- Gallucci, S., and Matzinger, P. (2001). Danger signals: SOS to the immune system. *Curr Opin Immunol* 13, 114-119.
- Garrett, W. S., Chen, L. M., Kroschewski, R., Ebersold, M., Turley, S., Trombetta, S., Galan, J. E., and Mellman, I. (2000). Developmental control of endocytosis in dendritic cells by Cdc42. *Cell* 102, 325-334.



- Geissmann, F., Launay, P., Pasquier, B., Lepelletier, Y., Leborgne, M., Lehuen, A., Brousse, N., and Monteiro, R. C. (2001). A subset of human dendritic cells expresses IgA Fc receptor (CD89), which mediates internalization and activation upon cross-linking by IgA complexes. *J Immunol* 166, 346-352.
- Grouard, G., Rissoan, M. C., Filgueira, L., Durand, I., Banchereau, J., and Liu, Y. J. (1997). The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J Exp Med* 185, 1101-1111.
- Guerder, S., and Matzinger, P. (1992). A fail-safe mechanism for maintaining self-tolerance. *J Exp Med* 176, 553-564.
- Guermonprez, P., Saveanu, L., Kleijmeer, M., Davoust, J., Van Endert, P., and Amigorena, S. (2003). ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature* 425, 397-402.
- Guermonprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Thery, C., and Amigorena, S. (2002). Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 20, 621-667.
- Guillemot, J. C., Montcourrier, P., Vivier, E., Davoust, J., and Chavrier, P. (1997). Selective control of membrane ruffling and actin plaque assembly by the Rho GTPases Rac1 and CDC42 in FcepsilonRI-activated rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells. *J Cell Sci* 110 ( Pt 18), 2215-2225.
- Hart, D. N., and Fabre, J. W. (1981). Demonstration and characterization of Ia-positive dendritic cells in the interstitial connective tissues of rat heart and other tissues, but not brain. *J Exp Med* 154, 347-361.
- Hartgers, F. C., Figdor, C. G., and Adema, G. J. (2000). Towards a molecular understanding of dendritic cell immunobiology. *Immunol Today* 21, 542-545.
- Hawiger, D., Inaba, K., Dorsett, Y., Guo, M., Mahnke, K., Rivera, M., Ravetch, J. V., Steinman, R. M., and Nussenzweig, M. C. (2001). Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J Exp Med* 194, 769-779.
- Heath, W. R., Belz, G. T., Behrens, G. M., Smith, C. M., Forehan, S. P., Parish, I. A., Davey, G. M., Wilson, N. S., Carbone, F. R., and Villadangos, J. A. (2004). Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunol Rev* 199, 9-26.
- Heath, W. R., and Carbone, F. R. (2001). Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 19, 47-64.
- Heit, A., Huster, K. M., Schmitz, F., Schiemann, M., Busch, D. H., and Wagner, H. (2004). CpG-DNA aided cross-priming by cross-presenting B cells. *J Immunol* 172, 1501-1507.
- Henri, S., Vremec, D., Kamath, A., Waithman, J., Williams, S., Benoist, C., Burnham, K., Saeland, S., Handman, E., and Shortman, K. (2001). The dendritic cell populations of mouse lymph nodes. *J Immunol* 167, 741-748.

- Hogquist, K. A., Jameson, S. C., Heath, W. R., Howard, J. L., Bevan, M. J., and Carbone, F. R. (1994). T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* 76, 17-27.
- Holt, P. G., Schon-Hegrad, M. A., and Oliver, J. (1988). MHC class II antigen-bearing dendritic cells in pulmonary tissues of the rat. Regulation of antigen presentation activity by endogenous macrophage populations. *J Exp Med* 167, 262-274.
- Houde, M., Bertholet, S., Gagnon, E., Brunet, S., Goyette, G., Laplante, A., Princiotta, M. F., Thibault, P., Sacks, D., and Desjardins, M. (2003). Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature* 425, 402-406.
- Huang, F. P., Platt, N., Wykes, M., Major, J. R., Powell, T. J., Jenkins, C. D., and MacPherson, G. G. (2000). A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes. *J Exp Med* 191, 435-444.
- Hugues, S., Mougneau, E., Ferlin, W., Jeske, D., Hofman, P., Homann, D., Beaudoin, L., Schrike, C., Von Herrath, M., Lehuen, A., and Glaichenhaus, N. (2002). Tolerance to islet antigens and prevention from diabetes induced by limited apoptosis of pancreatic beta cells. *Immunity* 16, 169-181.
- Husmann, L. A., and Bevan, M. J. (1988). Cooperation between helper T cells and cytotoxic T lymphocyte precursors. *Ann N Y Acad Sci* 532, 158-169.
- Inaba, K., Inaba, M., Naito, M., and Steinman, R. M. (1993). Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo. *J Exp Med* 178, 479-488.
- Iyoda, T., Shimoyama, S., Liu, K., Omatsu, Y., Akiyama, Y., Maeda, Y., Takahara, K., Steinman, R. M., and Inaba, K. (2002). The CD8+ dendritic cell subset selectively endocytoses dying cells in culture and in vivo. *J Exp Med* 195, 1289-1302.
- Jameson, S. C., Hogquist, K. A., and Bevan, M. J. (1995). Positive selection of thymocytes. *Annu Rev Immunol* 13, 93-126.
- Janeway, C. A., Jr. (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 54 Pt 1, 1-13.
- Janeway, C. A., Jr. (1992). The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol Today* 13, 11-16.
- Jarosch, E., Geiss-Friedlander, R., Meusser, B., Walter, J., and Sommer, T. (2002). Protein dislocation from the endoplasmic reticulum--pulling out the suspect. *Traffic* 3, 530-536.
- Jiang, W., Swiggard, W. J., Heufler, C., Peng, M., Mirza, A., Steinman, R. M., and Nussenzweig, M. C. (1995). The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* 375, 151-155.
- Johnson, A. E., and van Waes, M. A. (1999). The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15, 799-842.

- Jonuleit, H., Schmitt, E., Stassen, M., Tuettenberg, A., Knop, J., and Enk, A. H. (2001). Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med* 193, 1285-1294.
- Jordan, M. S., Boesteanu, A., Reed, A. J., Petrone, A. L., Hohenbeck, A. E., Lerman, M. A., Naji, A., and Caton, A. J. (2001). Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol* 2, 301-306.
- Jurgens, M., Wollenberg, A., Hanau, D., de la Salle, H., and Bieber, T. (1995). Activation of human epidermal Langerhans cells by engagement of the high affinity receptor for IgE, Fc epsilon RI. *J Immunol* 155, 5184-5189.
- Kaibuchi, K., Kuroda, S., and Amano, M. (1999). Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells. *Annu Rev Biochem* 68, 459-486.
- Kalinski, P., Hilkens, C. M., Wierenga, E. A., and Kapsenberg, M. L. (1999). T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol Today* 20, 561-567.
- Kappel, B. J., Pinilla-Ibarz, J., Kochman, A. A., Eng, J. M., Hubbard, V. M., Leiner, I., Pamer, E. G., Heller, G., van den Brink, M. R., and Scheinberg, D. A. (2006). Remodeling specific immunity by use of MHC tetramers: demonstration in a graft-versus-host disease model. *Blood* 107, 2045-2051.
- Kappler, J. W., Roehm, N., and Marrack, P. (1987a). T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell* 49, 273-280.
- Kappler, J. W., Wade, T., White, J., Kushnir, E., Blackman, M., Bill, J., Roehm, N., and Marrack, P. (1987b). A T cell receptor V beta segment that imparts reactivity to a class II major histocompatibility complex product. *Cell* 49, 263-271.
- Kapsenberg, M. L. (2003). Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol* 3, 984-993.
- Karlsson, M., Lundin, S., Dahlgren, U., Kahu, H., Pettersson, I., and Telemo, E. (2001). "Tolerosomes" are produced by intestinal epithelial cells. *Eur J Immunol* 31, 2892-2900.
- Kearney, E. R., Pape, K. A., Loh, D. Y., and Jenkins, M. K. (1994). Visualization of peptide-specific T cell immunity and peripheral tolerance induction in vivo. *Immunity* 1, 327-339.
- Keene, J. A., and Forman, J. (1982). Helper activity is required for the in vivo generation of cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 155, 768-782.
- Kerksiek, K. M., Niedergang, F., Chavrier, P., Busch, D. H., and Brocker, T. (2005). Selective Rac1 inhibition in dendritic cells diminishes apoptotic cell uptake and cross-presentation in vivo. *Blood* 105, 742-749.
- Kirberg, J., Bruno, L., and von Boehmer, H. (1993). CD4+8- help prevents rapid deletion of CD8+ cells after a transient response to antigen. *Eur J Immunol* 23, 1963-1967.
- Kjoller, L., and Hall, A. (1999). Signaling to Rho GTPases. *Exp Cell Res* 253, 166-179.

- Kleinclauss, F., Perruche, S., Cahn, J. Y., Tiberghien, P., and Saas, P. (2003). Administration of donor apoptotic cells: an alternative cell-based therapy to induce tolerance? *Transplantation* 75, 43S-45S.
- Kobayashi, H., Miura, S., Nagata, H., Tsuzuki, Y., Hokari, R., Ogino, T., Watanabe, C., Azuma, T., and Ishii, H. (2004). In situ demonstration of dendritic cell migration from rat intestine to mesenteric lymph nodes: relationships to maturation and role of chemokines. *J Leukoc Biol* 75, 434-442.
- Koch, F., Stanzl, U., Jennewein, P., Janke, K., Heufler, C., Kampgen, E., Romani, N., and Schuler, G. (1996). High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10. *J Exp Med* 184, 741-746.
- Korngold, R., and Sprent, J. (1987). Variable capacity of L3T4+ T cells to cause lethal graft-versus-host disease across minor histocompatibility barriers in mice. *J Exp Med* 165, 1552-1564.
- Kovacsovics-Bankowski, M., Clark, K., Benacerraf, B., and Rock, K. L. (1993). Efficient major histocompatibility complex class I presentation of exogenous antigen upon phagocytosis by macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 4942-4946.
- Kovacsovics-Bankowski, M., and Rock, K. L. (1995). A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science* 267, 243-246.
- Krisky, D. M., Marconi, P. C., Oligino, T., Rouse, R. J., Fink, D. J., and Glorioso, J. C. (1997). Rapid method for construction of recombinant HSV gene transfer vectors. *Gene Ther* 4, 1120-1125.
- Kundig, T. M., Shahinian, A., Kawai, K., Mittrucker, H. W., Sebzda, E., Bachmann, M. F., Mak, T. W., and Ohashi, P. S. (1996). Duration of TCR stimulation determines costimulatory requirement of T cells. *Immunity* 5, 41-52.
- Kuppner, M. C., Gastpar, R., Gelwer, S., Nossner, E., Ochmann, O., Scharner, A., and Issels, R. D. (2001). The role of heat shock protein (hsp70) in dendritic cell maturation: hsp70 induces the maturation of immature dendritic cells but reduces DC differentiation from monocyte precursors. *Eur J Immunol* 31, 1602-1609.
- Kurts, C., Cannarile, M., Klebba, I., and Brocker, T. (2001). Dendritic cells are sufficient to cross-present self-antigens to CD8 T cells in vivo. *J Immunol* 166, 1439-1442.
- Kurts, C., Heath, W. R., Carbone, F. R., Allison, J., Miller, J. F., and Kosaka, H. (1996). Constitutive class I-restricted exogenous presentation of self antigens in vivo. *J Exp Med* 184, 923-930.
- Kurts, C., Heath, W. R., Kosaka, H., Miller, J. F., and Carbone, F. R. (1998a). The peripheral deletion of autoreactive CD8+ T cells induced by cross-presentation of self-antigens involves signaling through CD95 (Fas, Apo-1). *J Exp Med* 188, 415-420.

- Kurts, C., Kosaka, H., Carbone, F. R., Miller, J. F., and Heath, W. R. (1997). Class I-restricted cross-presentation of exogenous self-antigens leads to deletion of autoreactive CD8(+) T cells. *J Exp Med* 186, 239-245.
- Kurts, C., Miller, J. F., Subramaniam, R. M., Carbone, F. R., and Heath, W. R. (1998b). Major histocompatibility complex class I-restricted cross-presentation is biased towards high dose antigens and those released during cellular destruction. *J Exp Med* 188, 409-414.
- Kurts, C., Sutherland, R. M., Davey, G., Li, M., Lew, A. M., Blanas, E., Carbone, F. R., Miller, J. F., and Heath, W. R. (1999). CD8 T cell ignorance or tolerance to islet antigens depends on antigen dose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 12703-12707.
- Kyburz, D., Aichele, P., Speiser, D. E., Hengartner, H., Zinkernagel, R. M., and Pircher, H. (1993). T cell immunity after a viral infection versus T cell tolerance induced by soluble viral peptides. *Eur J Immunol* 23, 1956-1962.
- Lamarche, N., and Hall, A. (1994). GAPs for rho-related GTPases. *Trends Genet* 10, 436-440.
- Langenkamp, A., Messi, M., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2000). Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat Immunol* 1, 311-316.
- Larsen, C. P., Steinman, R. M., Witmer-Pack, M., Hankins, D. F., Morris, P. J., and Austyn, J. M. (1990). Migration and maturation of Langerhans cells in skin transplants and explants. *J Exp Med* 172, 1483-1493.
- Latchman, D. S. (2002). Herpes simplex virus vectors for gene delivery to a variety of different cell types. *Curr Gene Ther* 2, 415-426.
- Lauterbach, H., Kerksiek, K. M., Busch, D. H., Berto, E., Bozac, A., Mavromara, P., Manservigi, R., Epstein, A. L., Marconi, P., and Brocker, T. (2004). Protection from bacterial infection by a single vaccination with replication-deficient mutant herpes simplex virus type 1. *J Virol* 78, 4020-4028.
- Lee, D. J., Cox, D., Li, J., and Greenberg, S. (2000). Rac1 and Cdc42 are required for phagocytosis, but not NF-kappaB-dependent gene expression, in macrophages challenged with *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* 275, 141-146.
- Levings, M. K., Sangregorio, R., and Roncarolo, M. G. (2001). Human cd25(+)cd4(+) t regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. *J Exp Med* 193, 1295-1302.
- Liblau, R. S., Wong, F. S., Mars, L. T., and Santamaria, P. (2002). Autoreactive CD8 T cells in organ-specific autoimmunity: emerging targets for therapeutic intervention. *Immunity* 17, 1-6.
- Liu, G. Y., Fairchild, P. J., Smith, R. M., Prowle, J. R., Kioussis, D., and Wraith, D. C. (1995). Low avidity recognition of self-antigen by T cells permits escape from central tolerance. *Immunity* 3, 407-415.

- Mackay, C. R. (1993). Homing of naive, memory and effector lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 5, 423-427.
- Mamalaki, C., Tanaka, Y., Corbella, P., Chandler, P., Simpson, E., and Kioussis, D. (1993). T cell deletion follows chronic antigen specific T cell activation in vivo. *Int Immunol* 5, 1285-1292.
- Matlack, K. E., Mothes, W., and Rapoport, T. A. (1998). Protein translocation: tunnel vision. *Cell* 92, 381-390.
- Matzinger, P. (1994). Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 12, 991-1045.
- Medzhitov, R., and Janeway, C., Jr. (2000). Innate immunity. *N Engl J Med* 343, 338-344.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C. A., Jr. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388, 394-397.
- Mellman, I., and Steinman, R. M. (2001). Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 106, 255-258.
- Miller, G., Pillarisetty, V. G., Shah, A. B., Lahrs, S., and DeMatteo, R. P. (2003). Murine Flt3 ligand expands distinct dendritic cells with both tolerogenic and immunogenic properties. *J Immunol* 170, 3554-3564.
- Mitchell, D. A., Nair, S. K., and Gilboa, E. (1998). Dendritic cell/macrophage precursors capture exogenous antigen for MHC class I presentation by dendritic cells. *Eur J Immunol* 28, 1923-1933.
- Moll, H., Fuchs, H., Blank, C., and Rollinghoff, M. (1993). Langerhans cells transport *Leishmania* major from the infected skin to the draining lymph node for presentation to antigen-specific T cells. *Eur J Immunol* 23, 1595-1601.
- Moon, S. Y., and Zheng, Y. (2003). Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. *Trends Cell Biol* 13, 13-22.
- Morelli, A. E. (2006). The immune regulatory effect of apoptotic cells and exosomes on dendritic cells: its impact on transplantation. *Am J Transplant* 6, 254-261.
- Morelli, A. E., Larregina, A. T., Shufesky, W. J., Zahorchak, A. F., Logar, A. J., Papworth, G. D., Wang, Z., Watkins, S. C., Falo, L. D., Jr., and Thomson, A. W. (2003). Internalization of circulating apoptotic cells by splenic marginal zone dendritic cells: dependence on complement receptors and effect on cytokine production. *Blood* 101, 611-620.
- Morgan, D. J., Kreuwel, H. T., Fleck, S., Levitsky, H. I., Pardoll, D. M., and Sherman, L. A. (1998). Activation of low avidity CTL specific for a self epitope results in tumor rejection but not autoimmunity. *J Immunol* 160, 643-651.
- Moser, M., and Murphy, K. M. (2000). Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nat Immunol* 1, 199-205.

- Mowat, A. M. (2003). Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol* 3, 331-341.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1, 263-273.
- Nakamura, K., Funakoshi, H., Miyamoto, K., Tokunaga, F., and Nakamura, T. (2001). Molecular cloning and functional characterization of a human scavenger receptor with C-type lectin (SRCL), a novel member of a scavenger receptor family. *Biochem Biophys Res Commun* 280, 1028-1035.
- Nakano, H., Yanagita, M., and Gunn, M. D. (2001). CD11c(+)B220(+)Gr-1(+) cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 194, 1171-1178.
- Nikolic-Zujic, J. (1991). Phenotypic and functional stages in the intrathymic development of alpha beta T cells. *Immunol Today*, 12, 65-70.
- Nimmerjahn, F., Bruhns, P., Horiuchi, K., and Ravetch, J. V. (2005). FcγR4: a novel FcR with distinct IgG subclass specificity. *Immunity* 23, 41-51.
- Nobes, C. D., and Hall, A. (1995a). Rho, rac and cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion and motility. *Biochem Soc Trans* 23, 456-459.
- Nobes, C. D., and Hall, A. (1995b). Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81, 53-62.
- Norbury, C. C., Chambers, B. J., Prescott, A. R., Ljunggren, H. G., and Watts, C. (1997). Constitutive macropinocytosis allows TAP-dependent major histocompatibility complex class I presentation of exogenous soluble antigen by bone marrow-derived dendritic cells. *Eur J Immunol* 27, 280-288.
- Nouri-Shirazi, M., and Guinet, E. (2002). Direct and indirect cross-tolerance of alloreactive T cells by dendritic cells retained in the immature stage. *Transplantation* 74, 1035-1044.
- O'Keeffe, M., Hochrein, H., Vremec, D., Scott, B., Hertzog, P., Tatarczuch, L., and Shortman, K. (2003). Dendritic cell precursor populations of mouse blood: identification of the murine homologues of human blood plasmacytoid pre-DC2 and CD11c+ DC1 precursors. *Blood* 101, 1453-1459.
- Ohashi, P. S., Oehen, S., Buerki, K., Pircher, H., Ohashi, C. T., Odermatt, B., Malissen, B., Zinkernagel, R. M., and Hengartner, H. (1991). Ablation of "tolerance" and induction of diabetes by virus infection in viral antigen transgenic mice. *Cell* 65, 305-317.
- Ohshima, Y., Tanaka, Y., Tozawa, H., Takahashi, Y., Maliszewski, C., and Delespesse, G. (1997). Expression and function of OX40 ligand on human dendritic cells. *J Immunol* 159, 3838-3848.

Oldstone, M. B., Nerenberg, M., Southern, P., Price, J., and Lewicki, H. (1991). Virus infection triggers insulin-dependent diabetes mellitus in a transgenic model: role of anti-self (virus) immune response. *Cell* 65, 319-331.

Palmer, E. (2003). Negative selection-clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. *Nat Rev Immunol* 3, 383-391.

Pamer, E., and Cresswell, P. (1998). Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing. *Annu Rev Immunol* 16, 323-358.

Pape, K. A., Kearney, E. R., Khoruts, A., Mondino, A., Merica, R., Chen, Z. M., Ingulli, E., White, J., Johnson, J. G., and Jenkins, M. K. (1997). Use of adoptive transfer of T-cell-antigen-receptor-transgenic T cell for the study of T-cell activation in vivo. *Immunol Rev* 156, 67-78.

Peche, H., Heslan, M., Usal, C., Amigorena, S., and Cuturi, M. C. (2003). Presentation of donor major histocompatibility complex antigens by bone marrow dendritic cell-derived exosomes modulates allograft rejection. *Transplantation* 76, 1503-1510.

Pfeifer, J. D., Wick, M. J., Roberts, R. L., Findlay, K., Normark, S. J., and Harding, C. V. (1993). Phagocytic processing of bacterial antigens for class I MHC presentation to T cells. *Nature* 361, 359-362.

Platt, N., da Silva, R. P., and Gordon, S. (1998). Class A scavenger receptors and the phagocytosis of apoptotic cells. *Biochem Soc Trans* 26, 639-644.

Pooley, J. L., Heath, W. R., and Shortman, K. (2001). Cutting edge: intravenous soluble antigen is presented to CD4 T cells by CD8- dendritic cells, but cross-presented to CD8 T cells by CD8+ dendritic cells. *J Immunol* 166, 5327-5330.

Propato, A., Cutrona, G., Francavilla, V., Ulivi, M., Schiaffella, E., Landt, O., Dunbar, R., Cerundolo, V., Ferrarini, M., and Barnaba, V. (2001). Apoptotic cells overexpress vinculin and induce vinculin-specific cytotoxic T-cell cross-priming. *Nat Med* 7, 807-813.

Pulendran, B., Banchereau, J., Maraskovsky, E., and Maliszewski, C. (2001). Modulating the immune response with dendritic cells and their growth factors. *Trends Immunol* 22, 41-47.

Quah, B. J., and O'Neill, H. C. (2005). Maturation of function in dendritic cells for tolerance and immunity. *J Cell Mol Med* 9, 643-654.

Rahemtulla, A., Fung-Leung, W. P., Schilham, M. W., Kundig, T. M., Sambhara, S. R., Narendran, A., Arabian, A., Wakeham, A., Paige, C. J., Zinkernagel, R. M., and et al. (1991). Normal development and function of CD8+ cells but markedly decreased helper cell activity in mice lacking CD4. *Nature* 353, 180-184.

Randolph, G. J., Beaulieu, S., Lebecque, S., Steinman, R. M., and Muller, W. A. (1998). Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking. *Science* 282, 480-483.

Ravetch, J. V., and Bolland, S. (2001). IgG Fc receptors. *Annu Rev Immunol* 19, 275-290.



- Redmond, W. L., and Sherman, L. A. (2005). Peripheral tolerance of CD8 T lymphocytes. *Immunity* 22, 275-284.
- Rees, M. A., Rosenberg, A. S., Munitz, T. I., and Singer, A. (1990). In vivo induction of antigen-specific transplantation tolerance to Qa1a by exposure to alloantigen in the absence of T-cell help. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 2765-2769.
- Reeves, J. (2001). Care and Handling of Laboratory Animals. *Current Protocols in Immunology*.
- Regnault, A., Lankar, D., Lacabanne, V., Rodriguez, A., Thery, C., Rescigno, M., Saito, T., Verbeek, S., Bonnerot, C., Ricciardi-Castagnoli, P., and Amigorena, S. (1999). Fcγ receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J Exp Med* 189, 371-380.
- Reis e Sousa, C., Stahl, P. D., and Austyn, J. M. (1993). Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro. *J Exp Med* 178, 509-519.
- Rescigno, M., Citterio, S., Thery, C., Rittig, M., Medaglini, D., Pozzi, G., Amigorena, S., and Ricciardi-Castagnoli, P. (1998). Bacteria-induced neo-biosynthesis, stabilization, and surface expression of functional class I molecules in mouse dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 5229-5234.
- Rescigno, M., Piguet, V., Valzasina, B., Lens, S., Zubler, R., French, L., Kindler, V., Tschopp, J., and Ricciardi-Castagnoli, P. (2000). Fas engagement induces the maturation of dendritic cells (DC), the release of interleukin (IL)-1β, and the production of interferon γ in the absence of IL-12 during DC-T cell cognate interaction: a new role for Fas ligand in inflammatory responses. *J Exp Med* 192, 1661-1668.
- Riedinger, M., Karjalainen, K., and Brocker, T. (1997). Targeted expression of MHC class II genes to dendritic cells in vivo. *Immunol Lett* 57, 155-158.
- Robinson, S. P., Patterson, S., English, N., Davies, D., Knight, S. C., and Reid, C. D. (1999). Human peripheral blood contains two distinct lineages of dendritic cells. *Eur J Immunol* 29, 2769-2778.
- Rocha, B., Tanchot, C., and Von Boehmer, H. (1993). Clonal anergy blocks in vivo growth of mature T cells and can be reversed in the absence of antigen. *J Exp Med* 177, 1517-1521.
- Rock, K. L., Gamble, S., and Rothstein, L. (1990). Presentation of exogenous antigen with class I major histocompatibility complex molecules. *Science* 249, 918-921.
- Rock, K. L., and Goldberg, A. L. (1999). Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu Rev Immunol* 17, 739-779.
- Romani, N., Holzmann, S., Tripp, C. H., Koch, F., and Stoitzner, P. (2003). Langerhans cells - dendritic cells of the epidermis. *Apms* 111, 725-740.
- Romisch, K. (1999). Surfing the Sec61 channel: bidirectional protein translocation across the ER membrane. *J Cell Sci* 112 ( Pt 23), 4185-4191.

- Ronchetti, A., Rovere, P., Iezzi, G., Galati, G., Heltai, S., Protti, M. P., Garancini, M. P., Manfredi, A. A., Rugarli, C., and Bellone, M. (1999). Immunogenicity of apoptotic cells in vivo: role of antigen load, antigen-presenting cells, and cytokines. *J Immunol* *163*, 130-136.
- Rubartelli, A., Poggi, A., and Zocchi, M. R. (1997). The selective engulfment of apoptotic bodies by dendritic cells is mediated by the  $\alpha(v)\beta3$  integrin and requires intracellular and extracellular calcium. *Eur J Immunol* *27*, 1893-1900.
- Ruedl, C., and Bachmann, M. F. (1999). CTL priming by CD8(+) and CD8(-) dendritic cells in vivo. *Eur J Immunol* *29*, 3762-3767.
- Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C., and Lanzavecchia, A. (1995). Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* *182*, 389-400.
- Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor  $\alpha$ . *J Exp Med* *179*, 1109-1118.
- Sallusto, F., Lanzavecchia, A., and Mackay, C. R. (1998). Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunol Today* *19*, 568-574.
- Sallusto, F., Palermo, B., Hoy, A., and Lanzavecchia, A. (1999). The role of chemokine receptors in directing traffic of naive, type 1 and type 2 T cells. *Curr Top Microbiol Immunol* *246*, 123-128; discussion 129.
- Sambrook, J. F., E. F. und Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual.*
- Sauter, B., Albert, M. L., Francisco, L., Larsson, M., Somersan, S., and Bhardwaj, N. (2000). Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *J Exp Med* *191*, 423-434.
- Schoenberger, S. P., Toes, R. E., van der Voort, E. I., Offringa, R., and Melief, C. J. (1998). T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* *393*, 480-483.
- Schuler, G., and Steinman, R. M. (1985). Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. *J Exp Med* *161*, 526-546.
- Schuurhuis, D. H., Fu, N., Ossendorp, F., and Melief, C. J. (2006). Ins and outs of dendritic cells. *Int Arch Allergy Immunol* *140*, 53-72.
- Schuurhuis, D. H., Ioan-Facsinay, A., Nagelkerken, B., van Schip, J. J., Sedlik, C., Melief, C. J., Verbeek, J. S., and Ossendorp, F. (2002). Antigen-antibody immune complexes empower dendritic cells to efficiently prime specific CD8+ CTL responses in vivo. *J Immunol* *168*, 2240-2246.
- Schwartz, R. H. (2003). T cell anergy. *Annu Rev Immunol* *21*, 305-334.

- Seastone, D. J., Zhang, L., Buczynski, G., Rebstein, P., Weeks, G., Spiegelman, G., and Cardelli, J. (1999). The small Mr Ras-like GTPase Rap1 and the phospholipase C pathway act to regulate phagocytosis in *Dictyostelium discoideum*. *Mol Biol Cell* *10*, 393-406.
- Sebzda, E., Mariathasan, S., Ohteki, T., Jones, R., Bachmann, M. F. and Ohashi, P. S. (1999). Selection of the T-cell repertoire. *Annu Rev Immunol* *17*, 829-874.
- Segura, E., Nicco, C., Lombard, B., Veron, P., Raposo, G., Batteux, F., Amigorena, S., and Thery, C. (2005). ICAM-1 on exosomes from mature dendritic cells is critical for efficient naive T-cell priming. *Blood* *106*, 216-223.
- Shen, Z., Reznikoff, G., Dranoff, G., and Rock, K. L. (1997). Cloned dendritic cells can present exogenous antigens on both MHC class I and class II molecules. *J Immunol* *158*, 2723-2730.
- Shevach, E. M. (2001). Certified professionals: CD4(+)CD25(+) suppressor T cells. *J Exp Med* *193*, F41-46.
- Shi, Y., Zheng, W., and Rock, K. L. (2000). Cell injury releases endogenous adjuvants that stimulate cytotoxic T cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 14590-14595.
- Shortman, K. (2000). Burnet oration: dendritic cells: multiple subtypes, multiple origins, multiple functions. *Immunol Cell Biol* *78*, 161-165.
- Shortman, K., and Wu, L. (2001). Parentage and heritage of dendritic cells. *Blood* *97*, 3325.
- Sigal, L. J., Crotty, S., Andino, R., and Rock, K. L. (1999). Cytotoxic T-cell immunity to virus-infected non-haematopoietic cells requires presentation of exogenous antigen. *Nature* *398*, 77-80.
- Singh-Jasuja, H., Toes, R. E., Spee, P., Munz, C., Hilf, N., Schoenberger, S. P., Ricciardi-Castagnoli, P., Neefjes, J., Rammensee, H. G., Arnold-Schild, D., and Schild, H. (2000). Cross-presentation of glycoprotein 96-associated antigens on major histocompatibility complex class I molecules requires receptor-mediated endocytosis. *J Exp Med* *191*, 1965-1974.
- Skokos, D., Le Panse, S., Villa, I., Rousselle, J. C., Peronet, R., David, B., Namane, A., and Mecheri, S. (2001). Mast cell-dependent B and T lymphocyte activation is mediated by the secretion of immunologically active exosomes. *J Immunol* *166*, 868-876.
- Slepnev, V. I., and De Camilli, P. (2000). Accessory factors in clathrin-dependent synaptic vesicle endocytosis. *Nat Rev Neurosci* *1*, 161-172.
- Speert, D. P., Wright, S. D., Silverstein, S. C., and Mah, B. (1988). Functional characterization of macrophage receptors for in vitro phagocytosis of unopsonized *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Invest* *82*, 872-879.
- Sprent, J., Lo, D., Gao, E. K., and Ron, Y. (1988). T cell selection in the thymus. *Immunol Rev* *101*, 173-190.

- Steinman, R. M., and Cohn, Z. A. (1974). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro. *J Exp Med* 139, 380-397.
- Steinman, R. M., Hawiger, D., and Nussenzweig, M. C. (2003). Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 21, 685-711.
- Steinman, R. M., and Nussenzweig, M. C. (2002). Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 351-358.
- Subklewe, M., Paludan, C., Tsang, M. L., Mahnke, K., Steinman, R. M., and Munz, C. (2001). Dendritic cells cross-present latency gene products from Epstein-Barr virus-transformed B cells and expand tumor-reactive CD8(+) killer T cells. *J Exp Med* 193, 405-411.
- Sun, E., Gao, Y., Chen, J., Roberts, A. I., Wang, X., Chen, Z., and Shi, Y. (2004). Allograft tolerance induced by donor apoptotic lymphocytes requires phagocytosis in the recipient. *Cell Death Differ* 11, 1258-1264.
- Takai, Y., Sasaki, T., and Matozaki, T. (2001). Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* 81, 153-208.
- Teasdale, R. D., D'Agostaro, G., and Gleeson, P. A. (1992). The signal for Golgi retention of bovine beta 1,4-galactosyltransferase is in the transmembrane domain. *J Biol Chem* 267, 4084-4096.
- Thery, C., and Amigorena, S. (2001). The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 13, 45-51.
- Thery, C., Duban, L., Segura, E., Veron, P., Lantz, O., and Amigorena, S. (2002a). Indirect activation of naive CD4+ T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nat Immunol* 3, 1156-1162.
- Thery, C., Zitvogel, L., and Amigorena, S. (2002b). Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol* 2, 569-579.
- Tisch, R., and McDevitt, H. (1996). Insulin-dependent diabetes mellitus. *Cell* 85, 291-297.
- Tse, H. Y., Schwartz, R. H., and Paul, W. E. (1980). Cell-cell interactions in the T cell proliferative response. I. Analysis of the cell types involved and evidence for nonspecific T cell recruitment. *J Immunol* 125, 491-500.
- Van Aelst, L., and D'Souza-Schorey, C. (1997). Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev* 11, 2295-2322.
- van Endert, P. M. (1996). Peptide selection for presentation by HLA class I: a role for the human transporter associated with antigen processing? *Immunol Res* 15, 265-279.
- van Oers, N. S., von Boehmer, H. and Weiss, A. (1995). The pre-T-cell receptor (TCR) complex is functionally coupled to the TCR- $\zeta$  subunit. *J Exp Med* 182, 1585-1590.

- Van Voorhis, W. C., Valinsky, J., Hoffman, E., Luban, J., Hair, L. S., and Steinman, R. M. (1983). Relative efficacy of human monocytes and dendritic cells as accessory cells for T cell replication. *J Exp Med* 158, 174-191.
- Vincent-Schneider, H., Stumptner-Cuvelette, P., Lankar, D., Pain, S., Raposo, G., Benaroch, P., and Bonnerot, C. (2002). Exosomes bearing HLA-DR1 molecules need dendritic cells to efficiently stimulate specific T cells. *Int Immunol* 14, 713-722.
- von Boehmer, H. (1990). Developmental biology of T cells in T cell-receptor transgenic mice. *Annu Rev Immunol* 8, 531-556.
- von Herrath, M. G., Yokoyama, M., Dockter, J., Oldstone, M. B., and Whitton, J. L. (1996). CD4-deficient mice have reduced levels of memory cytotoxic T lymphocytes after immunization and show diminished resistance to subsequent virus challenge. *J Virol* 70, 1072-1079.
- Wekerle, T., Kurtz, J., Bigenzahn, S., Takeuchi, Y., and Sykes, M. (2002). Mechanisms of transplant tolerance induction using costimulatory blockade. *Curr Opin Immunol* 14, 592-600.
- West, M. A., Prescott, A. R., Eskelinen, E. L., Ridley, A. J., and Watts, C. (2000). Rac is required for constitutive macropinocytosis by dendritic cells but does not control its downregulation. *Curr Biol* 10, 839-848.
- West, M. A., Wallin, R. P., Matthews, S. P., Svensson, H. G., Zaru, R., Ljunggren, H. G., Prescott, A. R., and Watts, C. (2004). Enhanced dendritic cell antigen capture via toll-like receptor-induced actin remodeling. *Science* 305, 1153-1157.
- Wherlock, M., and Mellor, H. (2002). The Rho GTPase family: a Rac to Rho story. *J Cell Sci* 115, 239-240.
- Wick, M. J., and Ljunggren, H. G. (1999). Processing of bacterial antigens for peptide presentation on MHC class I molecules. *Immunol Rev* 172, 153-162.
- Wiertz, E. J., Tortorella, D., Bogoy, M., Yu, J., Mothes, W., Jones, T. R., Rapoport, T. A., and Ploegh, H. L. (1996). Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature* 384, 432-438.
- Wilson, N. S., Behrens, G. M., Lundie, R. J., Smith, C. M., Waithman, J., Young, L., Forehan, S. P., Mount, A., Steptoe, R. J., Shortman, K. D., *et al.* (2006). Systemic activation of dendritic cells by Toll-like receptor ligands or malaria infection impairs cross-presentation and antiviral immunity. *Nat Immunol* 7, 165-172.
- Wilson, N. S., and Villadangos, J. A. (2005). Regulation of antigen presentation and cross-presentation in the dendritic cell network: facts, hypothesis, and immunological implications. *Adv Immunol* 86, 241-305.
- Yoon, J. W., and Jun, H. S. (2005). Autoimmune destruction of pancreatic beta cells. *Am J Ther* 12, 580-591.

Zehn, D., and Bevan, M. J. (2006). T cells with low avidity for a tissue-restricted antigen routinely evade central and peripheral tolerance and cause autoimmunity. *Immunity* 25, 261-270.



## 8 LEBENS LAUF

### Persönliche Daten

|              |  |
|--------------|--|
| Name         | Samira Maria Schroeder                           |
| Geburtstag   | 06. Mai 1973                                     |
| Geburtsort   | Braunschweig                                     |
| Nationalität | deutsch  |
| Wohnort      | Sophienstr. 28C, 38118 Braunschweig, Deutschland |

### Schulbildung

|              |  |
|--------------|--|
| 1979 - 1983  | Grundschule 7, Alt Wolfsburg                           |
| 1983 - 1992  | Orientierungsstufe und Gymnasium Kreuzheide, Wolfsburg |
| 14. Mai 1992 | Abitur am Gymnasium Kreuzheide, Wolfsburg              |

### Berufsausbildung

|             |  |
|-------------|--|
| 1993 - 1996 | Vorbereitungsdienst für die Laufbahn des Beamten im nichttechnischen gehobenen Verwaltungsdienst, Stadt Wolfsburg<br>Abschluss: <b>Diplom-Verwaltungswirtin (FH)</b> , 20. Juni 1996 |
|-------------|--|

### Studium

|             |   |
|-------------|---|
| 1996 - 1998 | Studium der Rechtswissenschaften an der Georg-August-Universität Göttingen  |
| 1998 - 2003 | Studium der Biologie an der Georg-August-Universität Göttingen<br>Hauptfach: Molekulare Genetik<br>Nebenfächer: Immunologie und Pharmakologie<br><br>Diplomarbeit:<br>Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF) in Braunschweig, Experimentelle Immunologie, Werner Müller: "Generierung von Mausmutanten mit gezielten Veränderungen in der zytoplasmatischen Domäne des $\beta_7$ -Integrin-Gens"<br><br>Abschluss: <b>Diplom-Biologin</b> , 18. Juli 2003 |

### Promotion

|                   |  |
|-------------------|--|
| 07/2003 – 12/2006 | Institut für Immunologie, LMU München, Abt. Prof. Thomas Brocker |
|-------------------|--|



**Veröffentlichungen**

- Neuenhahn, M., Kerksiek, K. M., Nauerth, M., Suhre, M. H., Schiemann, M., Gebhardt, F. E., Stemberger, C., Panthel, K., Schröder, S., Chakraborty, T., Jung, S., Hochrein, H., Rüssmann, H., Brocker, T. und Busch, D. (2006). CD8 $\alpha^+$  Dendritic Cells Are Required for Efficient Entry of *Listeria monocytogenes* into the Spleen. *Immunity* 25, 619-630.
- Luckashenak, N., Schroeder, S., Endt, K., Schmidt, D., Mahnke, D., Bachmann, M., Marconi, P., Deeg, C. and Brocker, T. (2008). Constitutive Crosspresentation of Tissue Antigens by Dendritic Cells Controls CD8 $^+$  T Cell Tolerance *in vivo*. *Immunity* 28, 521-532.



## 9 DANKSAGUNG

Herrn Prof. T. Brocker gebührt mein besonderer Dank dafür, dass er mich in seine Arbeitsgruppe aufgenommen hat und dafür, mir ein viel versprechendes, interessantes Projekt zur Dissertation zu überlassen, welches zudem zukunftsweisend für die medizinische Forschung sein könnte. Ich habe mich unter seiner Leitung stets sehr gut betreut gefühlt. Die gleichzeitig gewährte Freiheit bei der Anfertigung dieser Arbeit, sowie die Möglichkeit zur Teilnahme an zahlreichen Kongressen erlaubte mir, sehr wertvolle Erfahrungen und Erkenntnisse nicht nur wissenschaftlicher Art zu sammeln.

Frau Prof. E. Weiß danke ich für die Bereitschaft, meine Doktorarbeit offiziell zu betreuen und mir die Prüfung an der biologischen Fakultät der Universität München zu ermöglichen.

Es war mir jederzeit eine große Freude und es war stets sehr angenehm, mit so einer tollen Arbeitsgruppe wie der AG Brocker zusammenzuarbeiten. Ich danke allen Mitarbeitern aus der Arbeitsgruppe für die gegenseitige, ausnahmslose Hilfsbereitschaft und für das gute Teamwork, was nicht in jedem Labor selbstverständlich ist. Insbesondere danke ich Frau D. Schmidt und Herrn A. Gruber für das sorgfältige Korrekturlesen meiner Dissertation und Frau C. Ried für das Aushelfen bei umfangreichen Experimenten und während meines Urlaubes.

Frau A. Bol, R. Neumayer und Herrn W. Mertl danke ich für die ausnahmslos ausgezeichnete Pflege der Versuchstiere. Ihre Flexibilität und ihr Interesse ermöglichten es mir, Experimente auch kurzfristig zu planen und reibungslos durchzuführen. Andrea danke ich ganz privat außerdem für ihr offenes Ohr und ihre Anteilnahme.

U. Wolf, G. Mair, C. Rothenaigner sowie A. Kozar danke ich für die zuverlässige Hilfe in allen administrativen und organisatorischen Angelegenheiten.

Mein Dank gilt auch ganz besonders meinen Freunden, Josh und seiner Familie. Trotz teilweise großer Entfernungen gaben sie mir die Kraft und Liebe, die mich bis hierher gebracht hat und noch weiter bringen wird.